

Tetrazoliumvegyületek fényreakciói

III. A fény hatása a TTC kémiai és enzimatis redukciójára

JÁMBOR BÉLA

Eötvös Lóránd Tudományegyetem Növényélettani Intézet, Budapest

A tetrazoliumvegyületek biológiai alkalmazásáról beszámoló munkák többször említik, hogy az inkubálást sötétben kell végezni, illetőleg hogy egyes biológiai anyagok csak fény jelenlétében redukálják a TTC-t. Így pl. Mackenzie és Fuller [5] rámutatnak, hogy kísérleteik során a rákos sejtek TTC-vel kezelve csak fényen pirosodnak meg; Z w e i f a c h [6.] kiemeli, hogy szövetmetszetek enzimaktivitásának TTC-vel való vizsgálatánál a napfény kerülendő, stb. Az általános vélemény mégis az, hogy a fény zavaró hatása abban nyilvánul, hogy az indikátorként alkalmazott TTC redukáló hatás nélkül is diszproporcionálódik, formazán keletkezése közben. Gondolhatunk azonban arra a lehetőségre is, hogy a fény hatása nemcsak ebben áll, hanem, hogy az katalizálja az enzimatis illetve kémiai reakciót, esetleg a redukáló anyagok jelenléte katalizálja a fény okozta diszproporcionálódást. A kérdés részletesebb vizsgálata az elméleti szemponton felül azért látszik kívánatosnak, mert egyrészt képet kapunk arról, hogy milyen mértékű a fény zavaró hatása, tehát az óvatosságban meddig kell elmennünk, másrészt esetleg fel is használhatjuk a fény hatását igen gyenge redukációs hatások „felerősítésére”, amennyiben bebizonyosodik, hogy nem a redukáló anyagok katalizálják a diszproporcionálódást, hanem a fény katalizálja a redukciót.

Az eddigiek alapján [4] már nyilvánvaló volt, hogy fényen a TTC még redukáló anyag jelenléte nélkül is megpirosodik a diszproporcionálódási reakció kapcsán, s így fényen végezve az inkubálást, nem tudhatjuk, hogy a fénytől, vagy a redukáló szertől pirosodott-e meg. E kérdésrefigyelmünket Tárczy Jenő IV. éves biológia-kémia szakos hallgató azon tapasztalata irányította, hogy tejhez adott TTC a kémcső fény felőli oldalán pirosodott meg egy-két órai állás után, az ellenkező oldal fehér maradt, viszont a tiszta TTC oldat azonos koncentrációban ugyanakkor nem pirosodott meg.

Kísérleti rész

Módszerek és eszközök azonosak az előző közleményünkben leírtakkal [4].

A végzett kísérletek

1. Először azt a kérdést vizsgáltuk meg, hogy mennyire redukálódik a TTC fényen és sötétben, különböző p_H érték mellett, C-vitamin és élesztő hatására. Ezzel egy tisztán kémiai és egy enzimatis redukciót vizsgáltunk meg s megállapítottuk egyúttal, a reakciónak az oldat p_H értékétől való függését is. A kísérleti eredményeket az 1. és 2. ábra mutatja. A két ábrából a következőket szűrhetjük le:

a) $p_H = 10,8$ alatt az adott feltételek mellett sem a C-vitamin, sem az élesztő sötétben nem redukálta a TTC-t.

b) $p_H = 10,8$ felett az élesztő nem, a C-vitamin viszont nagymértékben redukálja a TTC-t.

c) Fényen a C-vitamin $p_H = 5$ felett redukálja a TTC-t, még pedig a p_H növekedésével növekedő mértékben.

d) Az élesztő legjobban $p_H = 6-8$ között redukálja fényen a TTC-t, $p_H = 7$ körül optimum van. $p_H = 10$ felett a redukáló képesség ismét nőni látszik, ezt azonban feltehetőleg nem enzimatis redukció idézi elő, hanem az élesztőben levő endogén redukáló anyagok.

A C-vitamin és az élesztő p_H görbáját összehasonlítva, szembetűnik a két görbe közötti lényeges eltérés, ami a kétféle redukció eltérő mechanizmusára vall.

2. A következő tisztázandó kérdés az volt, hogy a fény katalizálja-e a TTC redukcióját, vagy a redukálóanyagok katalizálják-e a TTC fényen való diszproporcionálódását. E kérdést úgy közelítettük meg, hogy mind C-vitamin, mind pedig élesztő jelenlétében különböző ideig fényen tartott TTC oldatot megpolarografáltuk annak megállapítására, hogy mennyi foto-TTC keletkezett. Ha u. i. a redukáló anyagok katalizálják a diszproporcionálódást, akkor azok jelenlétében annyival több foto-TTC-t kell az oldatban találnunk a fényhatás után, mint amennyivel több TF keletkezett a kontrollhoz viszonyítva. Ha viszont ennek megfordítottja áll fenn, vagyis a fény katalizálja a kémiai és enzimes redukciót, akkor kb. ugyanannyi foto-TTC-t kell találni a redukáló anyagok jelenlétében megvilágított oldatban, mint a redukálóanyag-mentes kontrollban. Az erre vonatkozó kísérleti adatokat az 1. táblázat mutatja.

Amint az adatokból látható, sem a C-vitamin, sem az élesztő esetében nem kísérte megfelelő foto-TTC többlet a TF-többletet, vagyis ez utóbbi nem diszproporcionálódás, hanem szabályos redukció útján keletkezett.

Redukálóanyagok hatására foto-TTC többlet helyett ellenkezőleg hiány lép fel a kontrollal szemben. Ez nyilvánvaló, ha meggondoljuk, hogy a „szabályos” redukcióra elhasznált TTC-ből nem keletkezhet foto-TTC. (Megjegyzendő, hogy a táblázat összetartozó adatainak összege egyes esetekben eltér a 100%-tól. Ennek

1. táblázat

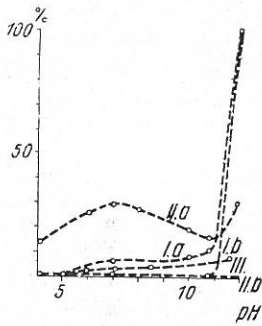
Élesztő és C-vitamin hatása levegő jelenlétében szőrt napfénynek kitett $10^{-3}M$ TTC oldatra. A reakció végén az oldatban levő TF, foto-TTC és TTC mennyisége az eredeti TTC mennyiség %-ában

Hozzáadott anyag	p_H	Fényen állás ideje órákban				Meghatározott anyag
		$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{2}$	1	2	
0,1% élesztő	7,1	4	10	15	30	TF TTC foto-TTC
		83	70	60	42	
		12	18	25	30	
—	7,1	3	5	8	13	TF TTC foto-TTC
		85	75	65	40	
		11	20	27	36	
$10^{-3}M$ C-vitamin	9,4	—	13	24	31	TF TTC foto-TTC
		—	69	53	45	
		—	20	26	31	
—	9,4	—	1	4	13	TF TTC foto-TTC
		—	78	65	47	
		—	22	32	39	

oka részben az, hogy az egyes értékek meghatározása különböző, önmagukban sem teljesen pontos módszerekkel történt, részben az, hogy a feltüntetett három vegyületen kívül kisebb mennyiségben más termékek is képződhettek.)

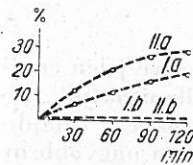
Fentiek kétségtelenné teszik, hogy a TF-többlet fény katalizálta redukcióból s nem redukáló anyagok által katalizált diszproporcionálódásból ered.

3. Az 1. és 2. ábra adatainak ismertetésekor mondtuk, hogy sötétben csak az adott feltételek mellett nem észleltünk TF kiválást redukáló hatásra. Ezzel azonban nem akarjuk azt mondani, hogy semleges közegben a TTC csak fény hatására redukálható, pl. élesztővel. Itt bővebben nem részletezett kísérleteink szerint a redukció sötétben is végbemegy megfelelő kísérleti feltételek mellett (pl. 37 °C, hosszabb reakciós idő, stb.). A fény tehát nem feltétele, hanem csak katalizálója a TTC redukciónak: lehetővé teszi a reakciót kedvezőtlen feltételek mellett is.



1. ábra

10^{-3} M TTC-ből 10^{-2} M C-vitamin (I.), ill. 1% élesztő (II.) hatására szórt napfényen (a), ill. sötétben (b) 2 óra alatt kivált TF koncentráció mennyisége (az eredeti TTC koncentráció %-ában) különböző pH-értékre beállított oldatban. III.: fényen állt, red. anyag nélküli kontrol.



2. ábra

Az 1. ábrán közölt kísérlet azon változata, hogy a reakciós időt változtattuk, az oldat pH-értékét pedig állandóan tartottuk: az élesztő esetében pH = 7,5, a C-vitaminos kísérletben pH = 10,8. Jelölések azonosak az 1. ábráéval

4. Említettük egy előző munkánkban [4], hogy kristályosodási gócek (CaCO₃, zselatin, stb.) jelenlétében a fény hatására TTC-ből kiváló TF mennyisége tetemesen fokozódik. Feltehető volt, hogy ez a hatás azon alapszik, hogy a TF kapilláráktívabb lévén a TTC-nél [2], adszorbensek jelenléte a TF keletkezését elősegíti: a reakciót gátló aktiválási energia egy részét u. i. az adszorpciós energia fedezi. Ha ez a feltételezésünk helyes, akkor ennek a gyorsító hatásnak nemcsak

2. táblázat

8 ml 10^{-3} M TTC, BT, ill. NT vízdátából 17,6 mg C-vitamin + 1 ml puffer + 10 mg zselatin + 1 ml víz jelenlétében, 16 óráig 26°-on sötétben való inkubálás után azonos módon kirázott formázán extinkciója (+zs). A kontrolok (-zs) zselatint nem tartalmaztak

Az inkubálási pH-érték	TTC		BT		NT	
	-zs	+zs	-zs	+zs	-zs	+zs
7,6	0	0	0	0,16	0,05	2,5
8,5	0	0	0,10	0,07	0,13	2,7
9,3	0	0	0,11	0,17	0,30	3,5
10,3	0,06	0,20	0,13	1,60	0,80	3,9

a fény hatására létrejövő diszproporcionálódási reakciónál kell mutatkoznia, hanem más olyan reakciónál is, ahol TF keletkezik.

Eszerint felületaktív anyagok jelenlétében a TTC kémiai redukciójának is gyorsabban kell lefolynia. E kérdés eldöntésére végzett kísérletünk eredményét a

2. táblázat közli. Vizsgálatunkat két ditetrazolium vegyületre is kiterjesztettük, s a p_H -értéket is variáltuk. Láthatjuk a táblázatból, hogy — különösen a ditetrazoliumvegyületeknél, — a zselatin jelenléte a redukció mértékét a kontrolhoz képest többszörösére fokozta.

5. Megvizsgáltuk azt is, hogy a BT kémiai és enzimátikus redukcióját fokozza-e a fény hatása, miután egyik előző közleményünk szerint [4] a diszproporcionálódási reakció — legalább is semleges közegben — nem jön létre fény hatására. 2. sz. kísérlet sorozatunk feltételei mellett élesztő és C-vitamin formazánképző hatását a BT esetében is megvizsgáltuk párhuzamosan napfényen és sötétben: azt tapasztaltuk, hogy a fényen levő oldatokban ugyanannyi formazán keletkezett, mint sötétben. D y a r [1] tehát helyesen járt el, amikor a kloroplasztok fotoredukáló hatását TTC helyett BT-vel vizsgálta.

Az eredmények megbeszélése

Összevetve jelen eredményeinket az előző közleményeinkben foglaltakkal [2, 3, 4], megállapíthatjuk, hogy a TTC biológiai használatánál a fény szerepe csak kisebb mértékben tulajdonítható a fénykatalizálta diszproporcionálódásának: ennél sokszorta nagyobb mértékben másítja meg az eredményt a fénynek magára a kémiai vagy enzimátikus redukcióra való katalizáló hatása. Az első kísérletben pl. semleges közegben sötétben sem a C-vitamin, sem az élesztő egyáltalában nem idézett elő formazánkiválást, viszont fényen ez jól mérhető módon bekövetkezett. Ez felveti azt a gondolatot, hogy gyengén redukáló anyagok kimutatására, sőt esetleg mérésére a fény ezen hatását szándékosan is alkalmazni lehetne. Ilyenkor az összehasonlító eredmények érdekében szigorúan standard fényviszonyokat kell biztosítani. Ez esetben a fényre érzékeny TTC-t kell használni, viszont ha a fény hatását ki akarjuk zárni, de mégis fényen kell inkubálnunk (mint ahogy az D y a r idézett munkájában történt), BT használandó.

Az adszorptív anyagok hatására vonatkozó vizsgálataink a tetrazolium vegyületek biológiai használatával kapcsolatban a formazánképződés mértékét befolyásoló újabb tényezőre hívják fel figyelmünket. Ezen tényezők, az eddigi munkáinkban közöltekkel együtt azt eredményezik, hogy nem számítható ki a reakció mértékéből a vizsgált biológiai anyag redoxpotenciálja. Ez csak akkor volna lehetséges, ha mind a biológiai rendszer, mind a használt indikátor reverzibilis redoxrendszer volna. Ezzel szemben:

a) A biológiai redoxrendszernek általában irreverzibilisek, csak bizonyos enzimek képesek a redoxindikátorokkal való reakciót közvetíteni.

* b) A tetrazolium vegyületek többé-kevésbé szintén irreverzibilisek, s így a redukciójuk csak túlfeszültséggel lehetséges.

c) Kolloidok jelenléte a kolloidtól és a közeg p_H -értékétől, valamint a használt indikátortól függően esetleg egy egész nagyságrenddel eltolhatja az eredményt. A biológiai anyagok mindig kolloid természetűek.

d) Hasonló hatású TTC esetében a fény is.

Ezek alapján világos, hogy a tetrazolium-vegyületeket mennyiségi mérésekre (pl. enzimaktivitás) csak a fentiek szigorú szem előtt tartásával lehet használni, de a minőségi eredmények összehasonlíthatósága is csak a kellő kautélák mellett lehetséges.

Végül köszönettel tartozom Tárczy Jenő kartársnak értékes közreműködéséért.

Összefoglalás

1. Fényen nemcsak a diszproporcionálódási reakció, hanem a kémiai és enzimátikus redukció is erősen fokozódik TTC esetében, a BT-fényre e téren is érzéketlen.

2. Kimutattuk, hogy a fokozott formazánkiválás oka a redukció fokozódása, nem pedig a diszproporcionálódásé.

3. Nagyfelületű anyagok (kolloidok, CaCO_3 , stb.) a formazán keletkezésével járó összes tanulmányozott reakciókat gyorsítják az adszorpciós energia révén. Ezek a reakciók: a TTC kémiai és enzimátikus redukciója, valamint fényhatásra történő diszproporcionálódása. Különösen nagy ez a hatás a ditetrazolium-vegyületekre (BT, NT).

Érkezett: 1955. március 1.

Irodalom

- [1] Dyar, M. T.: Amer. J. Bot. 40. 20. 1953.
 [2] Jámbor, B.: Acta Chim. Acad. Sci. Hung. 4. 55. 1954.
 [3] Jámbor, B.: Agrokémia és Talajtan. 5. 99. 1956.
 [4] Jámbor, B.: Agrokémia és Talajtan. 5. 89. 1956.
 [5] Mackenzie, L. M. & Fuller, D.: J. Lab. Clin. Med. 35. 314. 1950.
 [6] Zweifach, B. W., Black, M. M. & Shorr, E.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 76. 446. 1951.

СВЕТОВЫЕ РЕАКЦИИ ТЕТРАЗОЛИЕВЫХ СОЕДИНЕНИЙ

III. ВЛИЯНИЕ СВЕТА НА ХИМИЧЕСКОЕ И ФЕРМЕНТАТИВНОЕ ВОССТАНОВЛЕНИЕ ТТХ

Б. Ямбор

Кафедра физиологии растений Университета им. Л. Этв:ша, Будапешт (Венгрия)

Резюме

1. На свету сильно повышается не только реакция диспропорционирования ТТХ, но и химическое и ферментативное его восстановление. На BT свет и в этом отношении не влияет.

2. Показано, что причина усиленного выделения формазана заключается в усилении восстановления, а не диспропорционирования.

3. Объемистые вещества (коллоиды, CaCO_3 , и т. п.) посредством адсорпционной энергии ускоряют все изученные автором реакции, сопровождающиеся образованием формазана. Эти реакции следующие: химическое и ферментативное восстановление ТТХ и происходящее под действием света его диспропорционирование. Это действие особенно сильно выражено у дитетразолиевых соединений (BT, NT).

Рисунок 1.: Концентрация ТФ (в %-ах от исходной концентрации ТТХ), выделившегося в течение 2 часов из 10^{-3}M ТТХ при действии 10^{-2}M витамина С (I) и 1%-го дрожжевого раствора (II), на рассеянном солнечном свете (а) и в темноте (б), в растворах с различной величиной рН; 3: контроль (10^{-3}M водный раствор ТТХ).

Рисунок 2.: Вариант опыта, показанного на рисунке 1, в котором изменяли реакционное время, а величина рН раствора была постоянной: в случае дрожжевого раствора рН = 7,5, а в случае витамина С рН = 10,8. Обозначения те-же, как и на рисунке 1.

Die Lichtreaktionen der Tetrazoliumverbindungen

III. Die Einwirkung des Lichtes auf die chemische und enzymatische Reduktion des TTC

B. JÁMBOR

Pflanzenphysiologisches Institut der L. Eötvös Universität, Budapest (Ungarn)

Zusammenfassung

1. An dem Licht kann sich nicht nur die Disproportionierungsreaktion steigern, es steigert sich auch die chemische und enzymatische Reduktion stark im Falle von TTC; das BT ist auch in diesem Belange unempfindlich gegen Licht.

2. Wir haben erwiesen, dass die Ursache der erhöhten Formazanausscheidung die gesteigerte Reduktion ist und nicht die Steigerung der Disproportionierung.

3. Substanzen von grossen Oberflächen (Kolloide, CaCO_3 , etc.) beschleunigen die mit der Entstehung des Formazans verbundenen sämtlichen Reaktionen auf Grund der Adsorptionsenergie. Diese Reaktionen sind: die chemische und enzymatische Reduktion des TTC, sowie dessen auf Lichteinwirkung erfolgende Disproportionierung. Besonders gross ist diese Einwirkung auf die Reduktion der Ditetrazolium-Verbindungen (BT, NT).

Abb. 1.: Das aus 10^{-3} M TTC, auf Einwirkung von 10^{-2} M C-Vitamin (I) bzw. 1% Backhefe (II) nach 2 Stunden an diffusum Sonnenlicht (a) bzw. im Finstern (b) entstandene Formazan (in % der Anfangsmenge des TTC), in, auf verschiedene pH-Werte eingestellten Lösungen. III: Kontroll: (Im Licht gestanden, ohne Reduktionsmittel)

Abb. 2.: Eine derartige Variation des Versuches auf Abb. 1., dass wir die Reaktionszeit veränderten, den pH-Wert der Lösung konstant haltend; im Falle der Hefe war $\text{pH} = 7,5$ bei Vitamin-C $\text{pH} = 10,8$. Die Bezeichnungen gleich Abb. 1.

Tab. 1.: Einwirkung von Hefe und Vitamin-C auf eine 10^{-3} M TTC-Lösung, die luftzugänglich an diffusum Sonnenlicht stand. Am Ende der Reaktionszeit wurden folgende Mengen an TF, »Foto-TTC« und TTC in der Lösung bestimmt: (in % der Anfangskonzentration von TTC).

Tab. 2.: Extinktionswerte der ausgeschüttelten Formazane aus 8 ml 10^{-3} M wässriger TTC, bzw. BT, bzw. NT-Lösung, die nach Zugabe von 17,6 mg Vitamin-C, 1 ml Puffer, 10 mg Gelatine (+zs) und 1 ml Wasser 16 Stunden bei 26°C im Finstern inkubiert wurde. Die Kontrolle enthielten keine Gelatine (—zs).

Light Reactions in Tetrazolium Compounds

III. Effect of Light on the Chemical and Enzymatic Reduction of TTC

B. JÁMBOR

Institute for Plant Physiology L. Eötvös University, Budapest (Hungary)

Summary

1. With TTC, not only the disproportionation reaction but also the chemical and enzymatic reactions are markedly intensified in light, whereas BT is insensitive to light in these respects as well.

2. Intensified reduction, and not intensified disproportionation, is responsible for increased precipitation of formazan.

3. Owing to their adsorptive energy, substances of large surface (colloids, CaCO_3 , etc.) have been found to accelerate reactions concurrent with formazan formation. The reactions studied are the chemical and enzymatic reductions of TTC, and its disproportionation upon the action of light. Particularly intense is this action on ditetrazolium compounds (BT, NT).

Fig. 1. Amount of TF concentration (expressed as percentage of the original TTC concentration), which precipitated within 2 hours from 10^{-3} M of TTC (I) upon the action of 10^{-2} M of vitamin C and (II) upon that of 1 per cent yeast, in (a) scattered daylight and (b) darkness, in solutions adjusted to different pHs. III. Control (exposed to light, without reducing agent).

Fig. 2. Variant of the experiment in Fig 1; reaction times altered, p-s kept constant at 7,5 for yeast, and 10,8 for vitamin C. Other denotations the same as in Fig. 1.

Table 1. Effect of yeast and vitamin C upon 10^{-3} M of TTC solution exposed to scatter daylight in the presence of air. Amount of TF, photo-TTC, and TTC, present in the solution at the termination of the reaction, expressed as percentage of the original amount of TTC.

Table 2. Extinction of formazan obtained by shaking out from 8 ml of an aqueous solution of 10^{-3} M of TTC, BT, and NT, respectively, in the presence of 17,6 mg of vitamin C, 1 ml of buffer, 10 mg of gelatine, and 1 ml of water, after incubation at 26°C for 16 hours in darkness. Controls free of gelatine (—zs).