

A tetrazólium-vegyületek enzimológiája

1941-ben Kuhn és Jerchel [15] invert szappanokkal kapcsolatos vizsgálataik során bakteriosztatikus hatású anyagokat keresve újra elővették a Pechmann és Runge [26] által 50 éve előállított és régen feledésbe merült trifeniltetrazóliumkloridot. Vizsgálataik során megállapították, hogy ez a vegyület különböző biológiai anyagok hatására (élesztő, növényi anyagok stb.) piros, vízdoldhatatlan formazánná redukálódik. Már akkor kifejezésre juttatták azt a véleményüket, hogy a tetrazólium vegyületeknek ez a redukciója enzimek közreműködésével játszódik le és ezért biológiai felhasználásuknak is tág lehetősége nyílik.

Kuhn és Jerchel [15] munkája alapján Lakon [19] módszert dolgozott ki különböző magvak csírázóképeségének megállapítására trifeniltetrazóliumkloriddal (TTC). A háború folytán ezek a biológiai alkalmazással kapcsolatos munkák csak Németországra korlátozódtak, míg a háború után Dutcher németországi útja alkalmazásával megismerkedett a módszerrel és Mattson és Jensen-nel együtt írt közleményében [23] ismertette.

Ettől kezdve a tetrazólium-vegyületek biológiai alkalmazása mind rutinvizsgálatok, mind pedig kutatási célra hihetetlen mértékben elterjedt s ma már az erre vonatkozó irodalom több százra rúg. Nagy elterjedtségét alábbi előnyös tulajdonságainak köszönheti:

1. Míg a redox-indikátoroknak (pl. metilénkék) általában az oxidált alakja színes és a redukált alakja színtelen, addig a TTC oxidált alakja színtelen és redukált alakja színes. Mivel a redox-indikátorokat a biológiában általában redukáló hatások kimutatására, illetőleg mérésére használjuk, világos, hogy sokkal jobban észrevehető a változás akkor, ha az színtelenből színes formába való átalakulással történik.

2. A többi redox-indikátorral szemben a tetrazólium-vegyületek redukált alakja (formazánok) általában vízdoldhatatlan, ennek viszont két előnye van: a) A redukált alak a redukció helyén marad s így a redukáló enzimek topográfiai elhelyezkedése szöveten, sőt a sejten belül is megállapítható. b) A redukált alak oldhatatlansága folytán nem olyan érzékeny a levegő oxigénjére, mint pl. a leuko-metilénkék s így a TTC használatakor nem szükséges anaerob feltételeket biztosítani. Ez a munkát lényegesen egyszerűsíti.

3. Ugyanebben az irányban hat az a körülmény is, hogy a legtöbb formazán képződése irreverzibilis folyamat: a tetrazólium-vegyületek redukciója könnyűszerrel valósítható meg, viszont a formazánok oxidációja csak igen erőlyes oxidáló hatásra.

4. A biológiai alkalmazhatóság szempontjából az a körülmény is fontos, hogy a tetrazólium-vegyületek toxicitása kb. azonos, vagy kisebb mértékű, mint a többi redox-indikátoroké s így vitálisan is alkalmazható.

A fenti előnyös tulajdonságai miatt széleskörű kutatás indult meg egyrészt új tetrazólium-vegyületek előállítására, másrészt azok különböző alkalmazási módszereinek kidolgozására. Több százra tehető ma már az eddig előállított tetrazólium-vegyületek száma, biológiai célra csak néhány nyert alkalmazást.

Ami az alkalmazási módszereket illeti, ezek az alábbi csoportokba sorolhatók: 1. Dehidrogenáz-aktivitás mérése a Thunberg-technika analógiájára, mind ép szövetdarabokban, mind pedig homogenátumokban és sejt-szuszpenziókban. 2. Dehidrogenázok hisztokémiai kimutatása, *in vitro* történő inkubálás után. 3. Dehidrogenázok kimutatása a tetrazólium-vegyületek *in vivo* alkalmazása után készített metszetekben. 4. Nem-enzimatikusan működő redukáló vegyületek kimutatása, mérése (pl. cukrok, C-vitamin stb.).

A tetrazólium-vegyületek ezen sokoldalú és kiterjedt felhasználásának irodalmát többen is ismertették. [24, 30, 32, 38, 39]. Ez alkalommal a tetrazólium-vegyületek enzimátikus redukciójának mechanizmusát s az aktivitásmérés módszerét ismertetjük.

I. Az enzimes redukció mechanizmusa.

Kuhn és Jerchel [15] utalt rá először, hogy a biológiai anyagok hatására történő formazánképződésben enzimhatásnak is szerepet kell játszania. Ez két okból következik: 1. Hőkezelt biológiai anyagok elvesztik redukáló képességüket. 2. Biológiai anyagok már semleges közegben is képesek a TTC-t formazánná redukálni, míg kémiai redukálószer csak erősen lúgos közegben: pl. az aszkorbinsav, glutation és cisztein csak pH = 9, a redukáló cukrok csak pH = 11 felett váltanak ki formazánképződést [15].

Ez a következtetés mindmáig megállja helyét és a további kísérletekben igazolást nyert annak ellenére, hogy a kémiai redukáló anyagokkal kapcsolatban tett megállapításuk revízióra szorul. Roberts [34] ugyanis azt találta, hogy a cisztein, glutation SH és BAL semleges közegben is redukálja a TTC-t, megfelelő koncentrációviszonyok mellett.

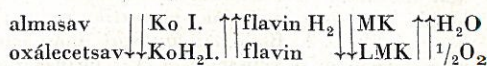
A vizsgált redox-indikátorok voltak: TTC, BT, NT, 2,3-difenil-5-metil-tetrazóliumklorid, NT-foszfát-2B, 2-naftil-3,5-difenil-tetrazóliumklorid, káliumtellurit, MK és reszazurin. Az

utóbbi két indikátort 10^{-5} M körüli koncentrációban, a többi és a redukáló anyagokat is 1% körüli koncentrációban alkalmazta, $\text{pH} = 7,4$ foszfát puffer jelenlétében végezve az inkubálást 2 óra hosszat, szobahőfokon, sötétben.

Roberts kísérleteinek eredményei azt mutatják, hogy a szulfhidril-vegyületek az adott körülmények között kisebb-nagyobb mértékben redukálták a fenti redox-indikátorokat, kivéve az 5-metil-2,3-trifenil-tetrazólium-kloridot. A MK-t csak a BAL redukálta. Szulfhidril-blokkoló anyagok gátlóhatását is megvizsgálta és változó mértékű gátlást tapasztalt.

Roberts azon az állásponton van, hogy a formazán-képződést biológiai anyagokban főleg a szulfhidril csoportok okozzák, bár esetenként más mechanizmus is közrejátszhat (enzimek). Findlay még tovább megy és ezen az alapon SN-meghatározási módszert dolgozott ki [9]. Roberts álláspontjának bizonyítékát abban látja, hogy különböző biológiai anyagok (szövetek) redukáló képessége ugyanazokon a helyeken a legnagyobb, ahol a legtöbb szulfhidril csoport van [2, 31, 32] továbbá, hogy a szövetek redukáló képességét cianid fokozza [1, 4, 33], jódcetamid [43] és egyéb szulfid-blokkolók gátolják [35]. Mivel azonban a szulfhidril-gátló anyagok gyakran csak csökkentik, de nem szüntetik meg teljesen a szövetek formazánképző hatását, Roberts arra a konklúzióra jut [34], hogy az indikátorok redukációját valószínűleg az élettanilag aktív rendszerek által fenntartott redoxpotenciál-szint okozza.

A tetrazólium-vegyületekhez sok tekintetben hasonlóan viselkedő MK-ra nézve Lockhart [22] már 1939-ben kimutatta, hogy a borsóból és a babból előállított diaforáz a hidrogént Ko I.-ről átviszi MK-re. 1940-ben már általánosan elfogadott nézet volt [12, 45], hogy az oxidált szubsztrát hidrogénjének útja a dehidrogenázokon (koenzimen) flavinenzimen át visz a MK-hez:



Hogy a tetrazólium-vegyületeknél is hasonló a helyzet, arra először Bielig utalt [3]: baktériumok TTC-t redukáló képességének pH-függése és hőérzékenysége arra vall, hogy egy flavóprotein, a diaforáz a közvetlen redukáló tényező. Mattson és társai [23] már korábban rámutattak, hogy a TTC-t redukálja a glukóz-dehidrogenáz, Ko I. jelenlétében; hogy flavinenzimek is jelen voltak-e arról az említett munka nem tesz említést. Későbbi munkájukban [14] Jensen és társai beszámolnak arról, hogy a TTC-t több, Ko I.-el kapcsolatos dehidrogenáz is redukálni képes, egyebek között a tejsav- és foszfoglicerín-aldehid-dehidrogenáz. Szerintük a rendszerek nem tartalmaztak sem flavóproteineket, sem citokromoxidázt, állítá-

sukat azonban kísérleti adattal nem támasztották alá. Egy régebbi munkájában Roberts is [31] annak a nézetének ad kifejezést, hogy dehidrogenáz enzimszisztemek oxidálják a szubsztrátokat és redukálják a TTC-t (csak 3 évvel későbbi munkájában tulajdonít a szulfhidril-vegyületeknek nagyobb fontosságot).

A tetrazólium-vegyületek enzimikus redukációjának mechanizmusát Brodie és Gots [5] munkája tisztázta. Kimutatták, hogy a foszfo-glicerinaldehid-dehidrogenáz Ko I. jelenlétében nem képes a TTC-t redukálni, bár maga a Ko I. redukálódik. Ha azonban pékelesztőből készült diaforázt is adtak a rendszerbe a Ko I. formazán képződés mellett oxidálódott. Bebizonyosodott tehát, hogy a redukált Ko I. egy maga nem képes a TTC-t redukálni, csak diaforáz közvetítésével. Ez egyúttal azt is jelenti, hogy a redoxpotenciál nem az egyedüli tényező a redukcióban. A TTC redukációs potenciálja semleges közegben (mormál kalomel elektródokhoz képest) $-0,38$ V, a Ko I. redoxpotenciálja $-0,57$ V, a flavinenziméé körülbelül $-0,36$ V, az alkohol acetaldehid rendszeré pedig $-0,48$ V. Legjobban tehát a Ko I.-nek kellene redukálni a TTC-t s mégis a TTC-val majdnem azonos energia szinten levő flavinenzim a közvetlen elektrondonor a TTC részére.

A TTC redukációjához szükséges energiát, vagyis a hidrogént és elektronokat, végeredményben a szubsztrát, jelen példában az alkohol szolgáltatja. Azt várhatnók tehát, hogy ennek legyen a láncolatban a legmagasabb energiaszintje, vagyis a legnegatívabb redoxpotenciálja. Mint látjuk azonban, a $-0,48$ V redoxpotenciálú alkoholt egy nála negatívabb energiaszintű anyag, a kodehidráz I. oxidálja. Ez a látszólagos ellentmondás azonban rögtön eltűnik, ha meggondoljuk, hogy a közölt redoxpotenciál-értékek normálállapotra vonatkoznak, vagyis az oxidált és redukált alkatrész 1:1 arányú elegyére. Ha tehát a rendszerben sok alkohol és kevés aldehid van, akkor az alkohol, acetaldehid rendszer aktuális redoxpotenciálja negatívabb lesz a megadott normál értéknél s a Ko I. már képes lesz oxidálni; különösen akkor, ha az utóbbinál az oxidált és redukált forma aránya ellenkező irányba tolódik, vagyis aktuális redoxpotenciálja pozitívabb lesz. Erről viszont a flavinenzimen keresztül a TTC, ill. természetes viszonyok közt a levegő oxigénje gondoskodik.

Brodie és Gots [5] kísérletei során teljesen redukált Ko I.-et is összehoztak TTC-vel s nem volt képes azt redukálni, pedig ilyen feltételek mellett ennek meg kellett volna történnie; ha viszont a Ko I.-nél gyengébben redukáló flavinenzimet is juttattak a rendszerbe a formazánképződés megindult. Nem vitás tehát, hogy a flavinenzim szerepe az, hogy lecsökkenti a TTC aktiválási energiáját és így redukációs potenciálját pozitív irányba tolja el, végered-

ményben tehát a flavinenzim a TTC-vel az enzim-szubstrát viszonyban áll.

Hasonló eredményre jutott Kun is [18]: triózfoszfatdehidrogenáz magában nem képes a TTC-t redukálni, csak ha mitokondriumokat (vagy azok butanolos kivonatát) adunk hozzá. Valószínű, hogy a mitokondriumokban egy flavinenzim, a citokrom-C-reduktáz a szükséges hatótényező. A TTC-t az aminosav-dehidrogenázok is redukálják melyek szintén flavin-enzimek.

Brodie és Gots [6, 7] további munkája során kimutatta, hogy a kristályos tejsav-, alkohol- és glicerín-dehidrogenáz sem képes magában redukálni a NT-ot, Ko I. jelenlétében sem. Ha ellenben az *Escherichia coli*-ből általuk előállított flavoproteint is a rendszerhez adják, a redukció (formazán-képződés) megindult. Ezen új flavoprotein tulajdonságai: 1. Csak Ko I.-től tud hidrogént és elektront átvenni, Ko II.-től nem. 2. Tipikus flavin-spektruma van. 3. A formazán-képződés pH-optimuma 7,8. 4. Dializált apo-enzimje FAD hozzáadására visszanyeri aktivitását. 5. Hidrolízis után a D-aminosav-oxidáz apoenzimjét aktívává teszi (ez is FAD jelenlétére vall).

Shelton és Schneider [37] szerint a tisztított xantin-oxidáz és a DPN-citokromreduktáz is gyorsan redukálják a TTC-t. Az előbbi furacinnal hasonlóképpen reagál [41].

Kuhn és Linke [16, 21] a TTC és MK redukcióját hasonlították össze. Ennek során a vizsgált rendszer alkohol + alkohol dehidrogenáz + Ko I. + különböző flavoprotein + TTC, ill. MK volt. TTC esetében aerob, MK esetében pedig anaerob körülmények között történt az inkubálás. A vizsgált flavoproteinek voltak: flavinmononukleotid-protein («régí sárga enzim») és az alloxazinadenin-dinukleotid-protein («új sárga enzim»), vagy diaforáz. A végzett kísérletek azt mutatták, hogy mindkét flavinenzim redukálni képes a TTC-t és MK-et; a régi sárga enzim azonban csak anaerob viszonyok közt. Ez ugyanis közvetlenül a levegő oxigénjének is képes leadni a hidrogént és elektronokat és ezért az oxigén kompetitív gátló hatást fejt ki a TTC és MK-el szemben.

A szerzők azt találták, hogy a TTC diaforáz hatására kb. 18-szor lassabban redukálódik, mint a MK. Ez szerintük várható is volt abból, hogy a TTC redukciós potenciálja kb. 100 mV-tal negatívabb, mint a MK redoxpotenciálja, vagyis az utóbbinak sokkal erősebben kell oxidálnia. Viszont Brodie és Gots [6] a NT és MK reakciósebességét az általuk izolált bakterium-flavoproteinnal kb. azonosnak találták. Az NT redukciós potenciálja a TTC-ével kb. azonos; ha a redukciós potenciál döntően el a reakciósebességet, akkor az NT-nak is 18-szor lassabban kellene redukálnia, mint a MK-nek, Kuhn és Linke [16, 21] adataihoz hasonlóan. De találhatók az irodalomban más ilyen adatok is a különböző redoxindikátorok össze-

hasonlításáról. Így pl. Price és Thimann [28] MK és 2,6-diklórfenolindofenol (DIP) redukciójának sebességét hasonlították össze: almasav-dehidrogenáz esetében a DIP elszíntelenedésének sebessége a MK-ének többszöröse volt. Ez magában véve éppen a redukciós potenciál döntő szerepére utalna, ugyanis a DIP redukciós potenciálja kb. 0,2 V-tal pozitívabb a MK-énél, ez tehát indokolta tenné a gyorsabb elszíntelenedését. Ugyanezek a szerzők azonban egy másik kísérletet is közölnek, amely azt mutatja, hogy a MK kifejezetten gátolja a DIP enzimek redukcióját zab és borsó mitokondriumok által, szukcinát vagy malát szubsztátumok jelenlétében. Ha pl. 10^{-4} M DIP jelenlétében az elszíntelenedést 100-nak vesszük, $5-10^{-4}$ M MK-et is adva a rendszerhez, az elszíntelenedés 61%-ra csökken. A MK ezen gátló hatásának mechanizmusáról azonban az idézett szerzők nem nyilatkoznak. Megemlíti, hogy Glock és Jensen [10] NT-al zab csíranövényben mintegy 30-szor lassúbb redukciót észleltek, mint DIP-el.

Price és Thimann [27] előző munkájában a zab-koleoptil borostyánkősav-dehidrogenázát inaktívnak találták MK és thionin irányában, viszont, — mint láttuk — a DIP-et simán redukálja [28].

Egy, a TTC-hez és MK-hoz hasonlóan működő redox-indikátor a furacin (5-nitro-2-furaldehid-semikarbazon) gátló hatásának mechanizmusát vizsgálta Gots, Jordan és Brodie [11]. Azt találták, hogy a furacin gátló hatást fejt ki a MK, a niluskék és TTC redukciójára, különböző dehidrogenáz szubsztátókat tartalmazó *Escherichia coli* szuszpenzióban. A gátló hatás oka szerintük különböző lehet:

1. Legkézenfekvőbb ok az, hogy a furacin verseng a másik indikátorral a hidrogénért. Valószínűleg ez a helyzet a MK esetében. A LMK-et u.i. a furacin visszaoxidálni nem tudja.

2. A niluskéket viszont vissza tudja a furacin oxidálni [és a gátlás magyarázata a szerzők szerint ebben van.

3. Az a magyarázat is elképzelhető, hogy a furacin közvetlenül a dehidrogenáz-enzimet gátolja, vagyis annak szubsztátójával verseng. Ezt alátámasztja egyrészt az, hogy Mk-el mért szukszcinó-dehidrogenáz-aktivitás furacin által okozott gátlása csökken, ha a szukszcinát koncentrációt növeljük. Másrészt az a tapasztalat is a 3. magyarázatot támasztja alá, hogy a MK és furacin gátló hatása [11, 28] sok esetben csak nagy koncentráció esetében számottevő.

Láthatjuk e néhány adatból is, hogy a redox-indikátorokat, — s így a tetrazólimvegyületeket is, nem lehet gépiesen használni enzimaktivitás mérésekre. A redukció sebességét s ezzel az egyes enzimek aktivitására kapott értékeket ugyanis nem egyedül az enzimek mennyisége determinálja, hanem abban több tényezőnek is fontos szerepe van: 1. Kétségtelenül fontos tényező a redoxpotenciál. 2. Lényeges

az is, hogy az egyes enzimek a redox-indikátorok aktiválási energiáját milyen mértékben csökkentik. Ez minden flavinenzimre ill. indikátorra nézve különböző mértékű. 3. Igen valószínű az is, hogy egyes indikátorok egyes enzimekre gátlólag hatnak akár a szubsztrátummal való versengés, akár, ahogy azt egyesek feltételezik [1, 13], a szulfhidril csoportok blokkolása révén.

Igy könnyen lehetséges, hogy egy redox-indikátor egy enzimek hidrogén-akceptora is és gátló anyaga is lehet egyszerre.

Mindebből azt a következtetést kell levonnunk, hogy a *Thunberg-módszerrel* (ill. annak változataival) azonos anyagban különböző enzimekre nézve kapott aktivitás-értékek egymással nem hasonlíthatók össze. Vagy meg kell tehát elégednünk ugyanazon enzimek kapott értékek összehasonlításával különböző anyagban, vagy külön vizsgálattal kell eldöntenünk, hogy az ismertetett gátló hatás nem forog-e fenn. Ez a nehézség azonban inkább elvi természetű csupán, mert gyakorlatilag rendszerint az a feladatunk, hogy egy bizonyos enzim aktivitását mérjük meg különböző anyagokban. Ez esetben pedig fenti nehézségekből adódó esetleges hibák az összes méréseket egyformán terhelik és így az eredmények aránya helyes lesz.

Összefoglalva a tetrazólium-vegyületek enzimes redukciójának mechanizmusáról eddig megállapított tényeket, elfogadhatjuk, hogy közvetlen proton, ill. elektron donorként csak flavin-enzimek szerepelnek. Ezek vagy közvetlenül, vagy Ko I. ill. Ko II.-vel kapcsolt dehidrogenáz útján oxidálják a szubsztrátot. Több-kevesebb biztonsággal eddig a következő flavin enzimekről állapították meg, hogy redukálni képesek a tetrazólium-vegyületeket: régi és új sárga enzim (diaforáz), aminosav-dehidrogenázok, Brodie és munkatársai baktérium-flavoproteinje, citokrom-c-reduktáz, xantin-oxidáz, szukcino-dehidrogenáz, élesztő-diaforáz.

Ezek közül azok, melyek a szubsztrátot közvetlenül nem képesek oxidálni a szubsztrátra specifikus, koenzimmel kapcsolt dehidrogenáz közbejöttével végzik el azt. Így minden dehidrogenáz kimutatása és mérése elvileg lehetséges egymás mellett, csak az inkubátumhoz adott szubsztrátot kell variálni aszerint, hogy melyik dehidrogenáz aktivitását kívánjuk mérni.

Megállapítható továbbá az is, hogy az egyes enzimek reakciósebessége az egyes indikátorokkal nagyon különböző lehet, sőt az indikátor gátló hatást is kifejthet a közvetlen donorra, vagy az előző lépés dehidrogenázára.

2. A dehidrogenáz-aktivitás mérése

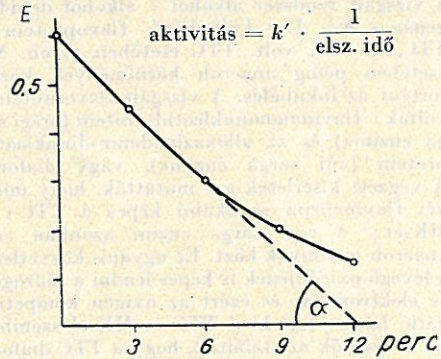
Az előzőkből kézenfekvőnek látszik a dehidrogenázok aktivitás mérése a megfelelő szubsztrátnak a vizsgált anyaghoz adásával, ahogy az már *Thunberg* módszeréből ismeretes [42]. E módszer lényege az, hogy a vizsgá-

landó anyagnak 1–200 mg-jához fölös mennyiségű szubsztrátot adunk és megfelelő pH-értékre beállított foszfát pufferral és MK-el oxigénmentes térben inkubáljuk pl. 37°-on, figyelve a MK elszíntelenedését. Ha tartalmaz a rendszer a hozzáadott szubsztrátnak megfelelő dehidrogenázt, a metilénkék néhány perc alatt elszíntelenedik. (1. ábra)

Mint látjuk, az elszíntelenedés eleinte lineárisan halad, majd a MK mennyiségének csökkenésével egyre lassúbbodik. A teljes elszíntelenedésig folytatva a mérést, a görbe aszimptotikusan közelíti meg az abszcisszát. A jelenség magyarázata az, hogy elegendő MK jelenlétében a reakció limitáló tényezője egyedül az enzim koncentrációja; később azonban ehhez a MK koncentrációja is csatlakozik a reakció O.-rendűből 1.-rendűvé válik. Könnyen belátható, hogy az enzimaktivitás az elszíntelenedési görbe egyenes részének iránytangensével lesz arányos, vagyis 2-szeres enzimaktivitás esetén az elszíntelenedési görbe kétszeres meredekebb lesz. Igen gyakran úgy járnak el, hogy az elszíntelenedési görbe fotometriás megállapítása helyett az elszíntelenedéshez szükséges időt mérik. Könnyen belátható, hogy nagyobb enzimaktivitásnak meredekebb görbe, és ezzel együtt rövidebb elszíntelenedési idő felel meg. Az 1. ábra alapján:

$$\text{aktivitás} = k \cdot \text{tg } \alpha = k \cdot 0,6/12$$

Mivel a MK indulási extinkciója állandó, ennek értéke beolvasható a konstansba s így:



1. ábra

Metilénkék elszíntelenedése Tam és Willson adatai alapján [40]

Az elszíntelenedési idő megállapítása azonban egyrészt nehéz, másrészt a kapott érték csak abban az esetben volna az aktivitással fordítva arányos, ha az elszíntelenedés egyenes lefutású volna (1. ábrán szaggatottan).

E szisztematikus hiba kiküszöbölésére újában nem a teljes, hanem csak a 90%-os elszíntelenedés idejének mérését írják elő [42]. Ez úgy valósítható meg, hogy összehasonlításként egy 10-ed annyi MK-et tartalmazó, enzim nélküli kémcsövet, ill. *Thunberg*-csövet használunk és

a színegyenlőség eléréséhez szükséges időt mérjük. Ezzel az elszíntelenedési görbe végének elhajlása miatti hiba nagyrészt elkerülhető.

A vizsgálathoz használt *Thunberg*-cső első részébe tesszük a MK-et, vagy az enzimetartalmú vizsgálandó anyagot s csak az evakuálás és az inkubálási hőfok elérése után, vagyis a mérés kezdetekor keverjük az oldat többi részéhez. Ezzel elérjük, hogy az előzetes műveletek folyamán a MK még ne kezdjen elszíntelenedni.

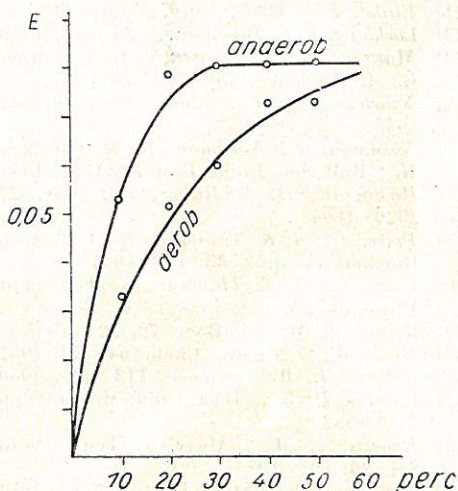
Az inkubálást két okból kell oxigénmentes térben végezni: egyrészt azért, mert a legtöbb flavinenzim akár közvetlenül, akár citokrom rendszeren át, át tudja adni az oxigénnek a hidrogént s így az oxigén a MK-vel versengve, az utóbbi elszíntelenedése lassúbb lesz. Az evakuálás szükségességének másik oka az, hogy a keletkező LMK-et az oxigén spontán vissza-oxidálja MK-é, ez szintén lassítja, esetleg meg is gátolja az elszíntelenedést.

A *Thunberg*-cső használata és az evakuálás elkerülhető azzal, ha az inkubáláshoz kiforralt

oldat nem nagyon zavaros, ami biológiai munkánál ritkán valósítható meg.

A levegő oxidáló hatása nem egyenlő mértékű a különböző redox-festékek esetében. A 2,6-diklórfenol-indofenol (DIP) eléggé stabil. Ezt használták Price és Thimann [28] vizsgálataikban. Még ennél is stabilabb a tetrazólium-vegyületek formazánja. Tetrazólium-vegyületeket használva hidrogén akceptorként, a formazánképződés időközönkénti fotometrállással jól követhető és a kapott görbélből az enzimaktivitás kiszámítható. Hátránya e módszernek az, hogy annyi *Thunberg*-csövet kell inkubálnunk, ahány formazán-értéket mérni akarunk, mivel a formazán fotometrállása (csapadék lévén) csak megfelelő oldószerrel való kioldás után lehetséges. Ez a nehézség elesik akkor, ha rutin-vizsgálatról van szó és nem akarjuk a formazánképződési időgörbe több pontját megállapítani, hanem csak egyet, mely a görbe lineáris részén van. Ezzel a görbe kezdeti iránytangense már megállapítható; ha az inkubációs időt állandóan tartjuk és úgy választjuk meg, hogy az annak megfelelő érték még a lineáris részre essék, akkor az így mért formazán mennyiség egyenesen arányos az enzimaktivitással.

E szempontok alapján dolgozták ki Kun és Abood [17] és mások [25, 36] szukcinodehidrogenáz-aktivitás meghatározási módszereiket. A szerzők kiemelik a TTC használatának azt az előnyét, hogy nem kell anaerob körülmények között dolgozni. A levegő jelenléte csak lassítja a formazán képződést, de a végső érték mindkét esetben azonos (2. ábra). Hogy ez a végső érték a TTC hány %-ának felel meg, az az idézett közleményből [17] sajnos nem derül ki, mert nem közli a fotometrállásnál használt küvetta vastagságát. Fel kell azonban tételni, hogy a közlemény összes extinkció értéke azonos küvetta vonatkozású és ebben az esetben a közlemény adataiból kiszámítható, hogy 2. ábránkon a TTC-redukciója 10%-ig megy, azután megáll. (Az idézett közleményben $E = 0,08$ -nak kb. $0,01$ mg TTC felel meg a standard-görbe szerint.) Ez igen érdekes, mert a 2. ábrán közölt görbék bőséges mennyiségű nátriumszukcinát jelenlétében készültek, tehát a szubsztrát nem fogyhatott el. A MK elszíntelenedési görbéje, viszont mint láttuk, a teljes elszíntelenedésnek megfelelően az abszcisszához tart aszimptotikusan, vagyis a reakció addig megy, amíg a MK el nem fogy. Hasonló a helyzet Lindemann [20] kísérleteinél is. Ő baktériumszuszpenzió dehidrogenáz-aktivitását mérte, illetőleg tanulmányozta a kísérleti feltételek hatását. Adataiból kitűnik, hogy a TTC csak kb. 40%-ig redukálódik (l. az idézett közl. 2. ábráját). A jelenséget azzal magyarázza, hogy egyrészt egyre kevesebb redukálható TTC áll rendelkezésre, másrészt a baktériumok csak korlátozott mennyiségű formazánt tudnak befogadni. Véleményem szerint az első feltételezés



2. ábra

1 mg TTC-redukciója 25 mg patkánymájhormonátum által Kun és Abood nyomán [17]

anyagokat használunk (kivéve természetesen az enzimet) és az oldathoz annyi zselatint is adunk, hogy az inkubálás hőfokán kocsonyás legyen. Ezáltal erősen lelassul az oxigén bedifundálása s az oldat belseje oxigénmentesnek tekinthető.

A MK használata esetén az elszíntelenedés fotometriás követése speciális *Thunberg*-csöveket igényel; ezek olyan koloriméterekben használhatók, melyek kémcső behelyezésére is alkalmasak. Azért kell a fotometrállást a *Thunberg*-csőben levő anyaggal végezni, mert annak felnyitásával levegő kerülne bele és a MK visszakéklése folytán hibás eredményt kapnánk. De még a *Thunberg*-csőben való fotometrállás is csak akkor végezhető el, ha az inkubált

csak a linearitástól való eltérést magyarázza meg, éppen úgy, mint azt a Mk esetében láttuk: ettől még el kellene érnie a görbének a 100% redukciót. Sokkal valószínűbbnek látszik a második feltevés, annál is inkább, mert a redukciókor keletkező formazán nem tud úgy eldifundálni, mint a LMK és az apoenzim felületén adszorbeálódva megakadályozza újabb TTC odajutását. Brodie és Gots [5] izolált enzim-rendszerekkel végzett kísérleteiben a TTC szintén csak kb. 10%-nyira redukálódott, vagyis a jelenség nincs sejtes szerkezethez kötve. Ezzel szemben Kuhn és Linke ugyancsak izolált enzimekkel 100%-os redukciót kapott [16, 21]. Ennek okára nézve csak feltevésekre támaszkodhatunk. A kérdés mielőbbi tisztázása szükségesnek látszik, mert a formazán adszorbeálódása a reakció kezdetén is befolyással lehet a sebességre, így végeredményben hibás eredményre vezet. Fokozza ennek veszélyét az a körülmény, hogy ez a hatás esetleg nem egyenlő mértékben jelentkezik a különböző vizsgált anyagoknál s így az eredményeknek nemcsak abszolút, hanem relatív értékét is megváltoztathatja.

További nehézségek is bonyolulttá teszik az enzimaktivitás mérését. Az e téren tisztázandó kérdések a következőkben foglalhatók össze:

1. Befolyásolja-e a kapott aktivitás értéket az anyag homogenizálása. 2. Tisztázandó a TTC behatolása a sejtekbe. 3. Az enzim-koncentráció növelésével a mért redukció néha nem lineárisan nő. Ennek oka ismeretlen [8, 29]. 4. Egyszerre több dehidrogenáz szubsztrátját adva a rendszerhez, az egy-egy szubsztráttal kapott redukciós értékek nem összegeződnek. Ez különösen endogen szubsztrát jelenlétében zavar.

Fenti nehézségek tisztázását célzó kísérleteink eredményeit rövidesen közöljük.

Érkezett 1955. március 1.

JÁMBOR BÉLA

Irodalom

- [1] Antopol, W., Glaubach, S. & Goldman, L.: Publ. Health Rep. **63**. 1231. 1948.
- [2] Barnett, R. J. & Seligman, A. M.: Science. **116**. 323. 1952.
- [3] Bielig, H. J., Kausche, G. A. & Haardick, H. Z.: Z. Naturf. **4**. B. 80. 1949.
- [4] Bodin, J. H., Lu, K. H. & West, W. L.: Biol. Bull. **102**. 16. 1952.
- [5] Brodie, A. F. & Gots, J. S.: Science. **114**. 40. 1951.
- [6] Brodie, A. F. & Gots, J. S.: Science. **116**. 588. 1952.
- [7] Brodie, A. F. & Gots, J. S.: Fed. Proc. **11**. 289. 1952.
- [8] Chiarioni, T. & Fiaccadori, F.: Arch. Sc. Biol. **38**. 33. 1954.
- [9] Findlay, G. H.: J. Histochem. Cytochem. **3**. 331. 1955.
- [10] Glock, E. & Jensen, C.: J. Biol. Chem. **201**. 271. 1953.
- [11] Gots, J. S., Jordan, V. E. & Brodie, A. J.: Arch. Biochem. Biophys. **36**. 285. 1952.
- [12] Green, D. E.: Mechanism of biological oxidations Cambridge, 1940.
- [13] Green, W. N., Heath, E. C. & Xall, I.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **76**. 152. 1951.
- [14] Jensen, C. O., Sachs, W. & Baldanski, F. A.: Science. **113**. 65. 1951.
- [15] Kuhn, R. & Jerchel, D.: Ber. **74**. B. 949. 1941.
- [16] Kuhn, R. & Linke, K.: Liebig's Ann. **578**. 1952. 155.
- [17] Kun, E. & Abood, L. G.: Science. **109**. 144. 1949.
- [18] Kun, E.: Proc. Soc. Expl. Biol. Med. **78**. 195. 1951.
- [19] Lakon, G.: Ber. dtsch. Bot. Ges. **60**. 299. 1942.
- [20] Lindemann, J.: Schweiz, Z. Allg. Path. Bakt. **17**. 311. 1954.
- [21] Linke, F.: Diss., Univ. Mainz. 1950.
- [22] Lockhart, E.: Biochem. J. **33**. 613. 1939.
- [23] Mattson, A. M., Jensen, C. O. & Dutcher, R. A.: Science. **106**. 294. 1947.
- [24] Nineham, A. W.: Chem. Rev. **55**. 355. 1955.
- [25] Nordman, J., Nordman, R. & Couchery, H.: Bull. Soc. Chim. Biol. **33**. 1826. 1951.
- [26] Pechmann, H. & Runge, P.: Ber. **27**. 2920. 1894.
- [27] Price, C. A. & Thimann, K. V.: Arch. Biochem. Biophys. **33**. 170. 1951.
- [28] Price, C. A. & Thimann, K. V.: Plant Physiol. **29**. 113. 1954.
- [29] Reiner, J. M.: J. Bact. **70**. 224. 1955.
- [30] Ried, W.: Angew. Chem. **64**. 391. 1952.
- [31] Roberts, L. W.: Science. **113**. 692. 1950.
- [32] Roberts, L. W.: Diss. Univ. Missouri. pp. 117. 1952.
- [33] Roberts, L. W.: Abstr. J. Tenn. Acad. Sci. **28**. 187. 1953.
- [34] Roberts, L. W.: Stain Techn. **29**. 63. 1954.
- [35] Roberts, L. W.: Stain Techn. **30**. 291. 1955.
- [36] Seligman, A. M. & Rutenburg, A. M.: Science. **113**. 317. 1951.
- [37] Shelton, E. & Schneider, W. C.: Anat. Rec. **112**. 61. 1952.
- [38] Smith, F. E.: Science. **113**. 751. 1951.
- [39] Soncin, E.: Arch. Ital. Sc. Pharm. **4**. 3. 1954.
- [40] Tam, E. K. & Wilson, P. W.: J. Bact. **41**. 529. 1941.
- [41] Taylor, J. D., Paul, H. E. & Paul, M. F.: J. Biol. Chem. **191**. 223. 1951.
- [42] Unbreit, W. W., Burris, R. H. & Stauffer, J. F.: Manometric Technics and Tissue Metabolism. Minneapolis. 1949.
- [43] Wachstein, M.: Proc. Sc. Expl. Biol. Med. **72**. 175. 1949.
- [44] Waygood, E. R.: Canad. J. Res. C **28**. 7. 1950.