

A FOSZFOLIPÁZOK BIOLÓGIAI ÉS PATOLÓGIAI SZEREPE*

MÉSZÁROS ISTVÁN

Tapolca Városi Tanács Egyesített Egészségügyi Intézménye Belgyógyászati Osztály

A foszfolipázok a foszfolipidek észterkötéseit hidrolízis útján hasító specifikus enzimek. Jelentőségüket szubsztrátjaik — a foszfolipidek — biológiai szerepe határozza meg.

A foszfolipidek

A foszfolipidek kémiaailag foszforsavdiészterek, amelyek felépítése a következő molekulákból történik:

1. első alkoholkomponens,
2. egy vagy két zsírsav,
3. foszforsav,
4. második alkoholkomponens.

Az első vagy fő alkoholkomponens a *glicerin* vagy a *szfingozin*. Előbbi háromértékű alkohol, az utóbbi aminodialkohol. A második alkoholkomponens a *kolin*, egy kvaterner ammóniumbázis, a *kolamin* vagy *etanolamin*, és ennek biológiai prekürzora a *szerin*, amely oxiaminósav. E három vegyület biogenetikailag rokon aminoalkohol. Második alkoholkomponens lehet továbbá a foszfolipid molekulában az *inozitol*, amely ciklusos hatértékű alkohol. Második alkoholkomponensként szerepelhet maga a *glicerin* is, amint az a foszfatidilglicerolban és a foszfatidil-3'-O-glicerolban történik. Foszfatidsavval észteresített glicerin képezi a második alkoholkomponenst a kardiolipinben is, s ezáltal annak molekulája három glicerinrészből épül fel.

Az első vagy fő alkoholkomponens alapján a foszfolipidek két osztályra oszthatók:

1. glicerin-foszfolipidekre,
2. szfingolipidekre.

A *glicerinfoszfolipidek*ben a kolin, etanolamin, szerin és a glicerin, a *szfingolipidek*ben a kolin vagy az etanolamin szerepel második alkoholkomponensként.

A glicerin foszfolipidekben a glicerin első két OH-csoportja hosszú szénláncú zsírsavval, a harmadik pedig foszforsavval van észteresítve, s az így

* X. Membrán Transzport Konferencián 1980. május 13–16. között Sümegen elhangzott előadás.

keletkezett foszfatidsavhoz kapcsolódik — ugyancsak észterkötéssel — a második alkoholkomponensek valamelyike. A 2- vagy β -pozíciójú észterkötés hidrolízisével, szabad zsírsav lehasításával *lizofoszfolipidek* keletkeznek, amelyek mint erélyes detergenssek, igen intenzív biológiai aktivitással, kifejezett membrán-destruktív hatással rendelkeznek. Ha a glicerin-foszfolipidekben az egyik zsírsav helyére enoléterként sztearin- vagy palmitinsavnak megfelelő aldehidek kapcsolódnak, *plazmalogének* keletkeznek. A lizofoszfolipidek és plazmalogének igen kis mennyiségben találhatók a sejtekben.

A kvantitatíve legjelentősebb foszfolipidek az emlős membránban:

- foszfatidil-kolin (lecitin)
- foszfatidil-etanolamin (kefalin)
- foszfatidil-szerin
- foszfatidil-inozitol
- szfingomielin,

a bakteriális és mitokondriális membránban:

- foszfatidil-etanolamin
- foszfatidil-glicerol
- difoszfatidil-glicerol (kardiolipin).

Az emlős citoplazmatikus membránok az említett foszfolipidek mellett — mint vízzöldékony poláris lipidet — koleszterint is tartalmaznak. A koleszterin hidrogénkötések és hidrofil interakciók révén kapcsolódik a foszfolipidekhez, s befolyásolja utóbbiak foszfolipázok általi hidrolízisét (DE KRUYFF és mtsai 1972).

A foszfolipid molekulák egyedüli tulajdonsága, hogy mint nem vízzöldékony poláris ún. amfipatikus lipidek, vizes közegben stabil *bilayer*-re rendeződnek, s ennek révén a biológiai membránok alapvető strukturális elemeivé váltak (GORTER és GREDEL 1925, DANIELLI és DAWSON 1935, ROBERTSON 1960, SINGER és NICOLSON 1972). Ez tette lehetővé a sejt s annak intracelluláris kompartment-rendszerének kialakulását, végső soron az élet keletkezését. Ezáltal a foszfolipidek mint biológiailag aktív vegyületek az élet *sine qua non*-jának tekinthetők.

A foszfolipidek számos további élettani szerepe is ismertté vált. Mint a lipoprotein makromolekulák alkotóelemei, a proteínekkel együtt lehetővé teszik a neutrális zsírok vízzöldékonyosságát s ettől elválaszthatatlan transzportját (FREDRICKSON és mtsai 1967). A kvantitatíve legjelentősebb foszfolipid szolgáltatja a zsírsavat a koleszterin észterítéséhez a lecitin-koleszterin-acil-transzferáz (LCAT) katalizálása révén (HANAHAN és mtsai 1960). Szerepük van továbbá az epe koleszterinjének oldatban tartásában (SMALL és RAPO 1970), a sejtek fúziójában (POOLE és mtsai 1970, LUCY 1970), a neuronális excitációban (COOCK és mtsai 1972), a leukociták lizoszomális enzimeinek aktivitásában (HAWIGER és mtsai 1972), az RNA-szintézis szabályozásában az RNA-polimerázra gyakorolt hatásuk révén (LEZIUS és MÜLLER-LORNSSEN 1972) s a biológiai kalcifikációban (WUTHIER 1973).

A foszfolipidek általános jelentőségét azonban az adja, hogy fiziko-kémiai sajátásaik révén a biológiai membránok folytonos dinamikus állapotban lévő strukturális és funkcionális elemeit képezik. Ennek megfelelően univerzálisak, valamennyi — állati, növényi és bakteriális — sejtben megtalálhatók.

A foszfolipázok felosztása

A foszfolipázok mint a foszfolipideket hidrolizáló enzimek, egyéb tényezők (H-kötések, ion interakciók, koleszterin, proteinek stb.) mellett, döntő szerepet játszanak a foszfolipidek anyagcseréjében, annak szabályozásában s a membrán-mátrix fiziko-kémiai állapotára gyakorolt közvetlen hatások révén a biológiai membránok struktúra- és funkcióváltozásában, végül is a sejtek életfolyamatában. A foszfolipidek — szubsztrátjaikhoz hasonlóan — ubiquiterek, egyaránt megtalálhatók az állati, növényi és mikrobiális sejtekben.

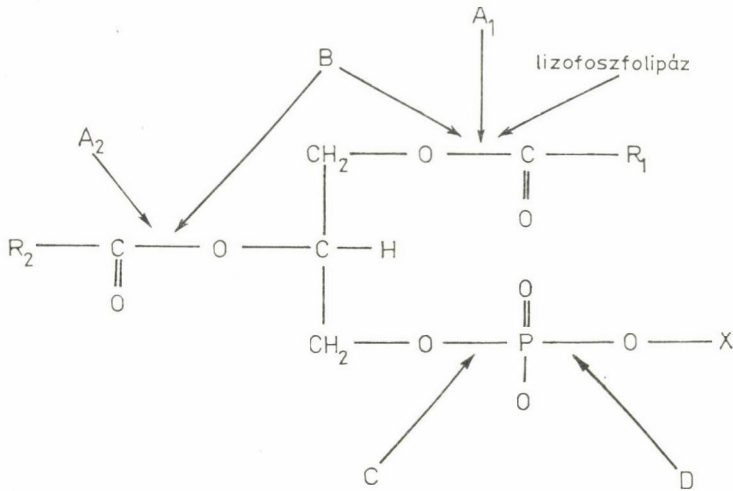
A különböző állati mérgek kémiai szerkezetüket és hatásukat tekintve egymástól igen eltérő, biokémiailag, biológiailag és farmakológiailag aktív anyagok bonyolult keverékének tekintendők. Csaknem valamennyi lényeges hatóanyaguk aminosavakból származik, s 1. a biogén aminok, 2. a polipeptidok és 3. a fehérjék közé sorolható. Számos közös, illetve hasonló komponens tartalmaznak (HABERMANN 1968, 1972). Az enzimek között a foszfolipáz mindig, a hialuronidáz pedig csaknem mindig megtalálható. Az állati és bakteriális mérgekben előforduló hialuronidáz azok ún. „spreading factor”-ával azonos (CHAIN és DUTHIE 1940, HABERMANN 1968, 1972).

A foszfolipázokat szubsztrátjaikon kifejtett hidrolitikus aktivitásuk helye szerint A-B-C-D- betűkkel jelölik, illetve osztják fel. Eszerint a foszfolipáz A_1 a glicerín-foszfolipid 1- vagy α -acil kötését, a foszfolipáz A_2 annak 2- vagy β -acil kötését hidrolizálja. A foszfolipáz C foszfát csoporttal, a foszfolipáz D anélkül hasítja le a glicerín-foszfolipid vagy a szfingolipid molekuláról a vízdékony bázikus második alkoholkomponenset (1. ábra). E felosztás korántsem tökéletes, mivel az egyes foszfolipázok szubsztrát-specifitása, optimális aktivitási feltételei és hasítási termékei között jelentős különbségek vannak.

A lizofoszfolipázok ugyancsak az acilkötés hidrolizálásával bontják a lizofoszfolipideket, s számos emlős szövetben (MARPLES és THOMPSON 1966), valamint a legkülönbözőbb mikrobákban megtalálhatók.

A foszfolipázok jelölését a Nemzetközi Biokémiai Unió nomenklatúrája szerint az 1. táblázat mutatja.

A hidrolízis helye szerint az acil-hidrolizáló foszfolipáz A_1 , A_2 és B, valamint a lizofoszfolipázok karbonsavészterázoknak, a vízdékony bázist hasító foszfolipán C és D foszfodiészterázoknak tekintendők.



1. ábra. A foszfolipázok és a lizofoszfoplipáz általi hidrolízis helyei a foszfolipid molekulán (ROMICS és SZOLLÁR 1977)

I. táblázat

A foszfolipázok jelölése a Nemzetközi Biokémiai Unió szerint
(Enzim Nomenklatúra, 1973)

Foszfolipáz A	foszfatidát-acilhidroláz	
Foszfolipáz A ₁	foszfatidát-1-acilhidroláz	E.C. 3.1.1.32
Foszfolipáz A ₂	foszfatidát-2-acilhidroláz	E.C. 3.1.1.4
Lizofoszfolipáz	lizofoszfátid-acilhidroláz	E.C. 3.1.1.5
Foszfolipáz B	foszfatidát- és lizofoszfátidát-acilhidroláz	
Foszfolipáz C	foszfatidilkolin-kolínfoszfohidroláz	E.C. 3.1.4.3
Foszfolipáz D	foszfatidilkolin-foszfatidilhidroláz	E.C. 3.1.4.4

(MÖLLBY 1978)

A szubsztrátspecifitás szűkítésével a C és D típusú foszfolipázok glicero-foszfolipáz C- és D-re, valamint szfingomielináz C- és D-re, a lizofoszfolipázok pedig lizofoszfolipáz A-, C- és D-re oszthatók.

A foszfolipázok viszonylag koncentráltan találhatók az állati mérgekben, a pancreas-nedvben, valamint a bakteriális toxinokban. Ebből adódik, hogy vizsgálatuknak egyrészt az állati, másrészt a bakteriális toxinok egyre intenzívebb kutatása révén a toxinológia adott lendületet. DELEZENNE és mtsai (1911, 1914) a század elején írták le a kobra mérgec lecitin hasító s lizolecitint felszabadító hatását. MACFARLANE és KNIGHT (1941) közleményéből derült ki elsőként, hogy *Cl. welchii* α -toxinja szintén lecitináz hatással rendelkezik. A kobramérgec hatása foszfolipáz A₂, a *Cl. welchii* α -toxinjáé foszfolipáz C aktivitásnak felel meg.

A típusú foszfolipázok és lizofoszfolipázok

Valamennyi foszfolipáz közül a foszfolipáz A a legelterjedtebb és legismertebb. Csaknem minden sejtféleségben kimutatták, a bakteriálistól az emlős sejtekig. Megtalálhatók továbbá a pancreas és hasonló exokrin mirigyek szekrétumában, valamint az állati mérgekben. Feltételezik, hogy jelentős szerepük van a membrán-foszfolipidek anyagszerjének szabályozásában. A sejtekhez való viszonyukban extracellulárisak vagy intracellulárisak.

Az állati mérgekben, valamint a pancreas nedvben kiválasztott — kedvezőbb izolálási lehetőséget nyújtó — *extracelluláris* A típusú foszfolipázok a legismertebbek. Vízoldékonyak, specificitásuk a 2-acil gyökkel szembeni, aktivitásuk Ca^{++} szükséges, molekulásúlyuk 14 000 körüli, hat—hét diszulfid hídjuk van (van den BOSCH 1974). A legismertebb a sertéspancreasból származó foszfolipáz A_2 . Zimogén formában 130, aktív formában 123 aminosavból áll, hat diszulfid hídja van, rendkívül stabil (de HAAS 1970). Az *intracelluláris* foszfolipáz A kevésbé ismert, mivel többnyire membránhoz kötött s nehezen oldható és izolálható.

Számos emberi és állati szövetben, valamint testfolyadékban, így bélyálcakártyában (SCHMIDT és mtsai 1957, EPSTEIN és SHAPIRO 1959, OTTOLENGHI 1964), pancreasban (RIMON és SHAPIRO 1959, MAGEE és mtsai 1962, van DEENEN és mtsai 1963), agyból (GALLAI-HATCHARD és mtsai 1962, GATT és mtsai 1963), májból (SCHERPHOF és van DEENEN 1965, BJØRSTAD 1966), veséből, tüdőből, szívből és lépből (ROBERTSON, 1966), granulocitákból (ELSBACH és RIZAK 1963), heparinos plazmából (VOGEL és ZIEVE 1961) mutattak ki foszfolipáz A aktivitást.

A különböző baktériumok hosszú sorában is előfordul a foszfolipáz A, olykor lizofoszfolipázokkal együtt. Kimutatták aktivitását intracellulárisan az *E. coli* különböző törzseiben, a *Mycobacterium phlei*-ben, a *Vibrio parahaemolyticus*-ban, a *Bacillus subtilis*-ben, a *Staphylococcus aureus*-ban, a *Clostridium sordelli*-ben, a *Bacillus megathericum*-ban, továbbá a *Butyrivibrio sordelli*-ben (MÖLLBY 1978). Az *E. coli*-ban detergens-rezisztens, valamint detergens-szenzitív foszfolipáz A-t és lizofoszfolipázt találtak (DOI és NOJIMA 1975). A *B. subtilis* membránhoz kötött foszfolipáz A_1 és vízoldékony lizofoszfolipáz szintézisére is képes (KENT és LENNARZ 1972).

Egyes baktériumok exkrétuma is mutat foszfolipáz A aktivitást. Az extracelluláris foszfolipázok hemolitikus hatással rendelkezhetnek (LIU 1966). PUGH és CAWSON (1977) vizsgálatai szerint a *Candida albicans* blasztoporamembránnal összefüggő foszfolipáz A-t és lizofoszfolipázt képes termelni. Cito-kémiai módszerekkel kimutatták, hogy a csirkeembrió korion-allantoisz epitél-sejtjeit elárasztó *Candida albicans* növekedésben levő hifáin foszfolipáz A exkréción van. Ezek a megfigyelések a bakteriális foszfolipáz A direkt toxikus vagy direkt virulencia fokozó hatását igyekeznek alátámasztani. Mindez fi-

gyelmet érdemel, ugyanis számos baktérium tartalmaz foszfolipáz A-t a burkában is, és a mechanizmus, amely révén a baktériumok a gazdasejtekbe hatolnak, ma még kevésbé ismert.

A foszfolipáz A biológiai károsító hatása három módon érvényesülhet: 1. a strukturális foszfolipidek enzimatis bontása révén, 2. a keletkező lizofoszfolipidek citolitikus hatásán keresztül, 3. a felszabaduló és felszaporodó szabad zsírsavak biológiai hatása által.

A tisztított fofolipáz A csak akkor fejti ki enzimatis hatását, ha a reakcióközegben megfelelő szubsztrát — lipoproteinek, tojássárgája, vvt.-hemolizátum — áll rendelkezésre. A szérum albumin és a szabad zsírsavak pedig aktivátorai az enzimnek (HABERMANN 1968, 1972). Az aktivált enzim számos farmakológiai hatása közül a következők a lényesebbek:

Hemolízis: A foszfolipáz A indirekt hemolitikus tényező. Mosott vvt.-szuszpenzióban egyáltalán nem indít el hemolízist, csak azután, ha a rendszerhez alkalmas szubsztrátot adnak. A hatására keletkező lizolecitin az a tényező, amelynek direkt hemolitikus hatása van (HABERMANN 1955, 1958), (IBRAHIM és THOMPSON 1965, JOSHUA és ISHAY 1973).

A trombociták és a granulociták károsítása: A foszfolipáz A a vvt.-ekhez hasonlóan oldja a sóoldatban szuszpendált trombocitákat, s szerotonint szabadít fel belőlük, teljes vérben azonban a plazmaalbumin gátolja a trombociták oldását (HABERMANN és SPRINGER 1958, KIRSCHMANN és mtsai 1963). Ugyan csak a keletkezett lizolecitin révén oldja az enzim az izolált leukocita lizozómákat (WEISSMANN és mtsai 1964).

A hízósejtek károsítása: A foszfolipáz A a vvt.-ekhez hasonlóan oldja a hízósejteket, s azokból hisztamint és heparint, valamint más biológiaiag aktív anyagokat szabadít fel (BLOOM és HAEGERMARK 1967, FREDHOLM és HAEGERMARK 1967). A hízósejtek szétesése is csak akkor következik be, ha a lizolecitin keletkezéséhez alkalmas foszfolipidek rendelkezésre állnak a szövetekben vagy az inkubációs közegben (ROTHSCHILD 1965).

Enzimiek gátlása: A foszfolipáz A több struktúrához kötött enzim és enzim-rendszer aktivitását képes csökkenteni. Gátolja — többek között — a szöveti trombolasztint, az oxidatív foszforilálást (VÁZQUEZ-COLÓN és ELLIOTT 1966, AUGUSTYN és mtsai 1970), az ATPáz, a szukcinát-dehidrogenáz (NEUMANN és mtsai 1952, 1954, HABERMANN 1954). Klinikai megfigyelés alapján feltételezhető, hogy a foszfolipáz A által felszabadított és megszorodott szabad zsírsavak a glukuroniltranszferáz gátolni képesek (MÉSZÁROS 1975, 1976).

B típusú foszfolipázok

A B típusú foszfolipázok az 1- és 2-acilgyökök hidrolízise révén egyaránt képesek kihalítani a zsírsav molekulákat az intakt foszfolipidekből, valamint a keletkezett lizofoszfolipidekből.

A foszfolipáz B önálló enzim volta hosszú idő óta vitatott, mivel a B típusú aktivitás két különböző entitásra, foszfolipáz A-ra és lizofoszfolipázra bontható (KAWASAKI és SAITO 1973). CONTARDI és LATZER (1928) már fél évszázada leírta, hogy a darázs (*Vespa vulgaris*) mérgének foszfolipáz A mellett foszfolipáz B aktivitása is van. Ezt újabban HABERMANN (1968) megerősítette, de szerinte is kérdéses, hogy a lecitin két zsírsavmaradványának lehasítása két különböző szukcesszíve ható enzim (A és B) vagy egyetlen enzim (A + B) hatására következik-e be. DOERY és PEARSON (1963) kígyó- és méhméregben mutatta ki az enzimet.

Foszfolipáz B aktivitást találtak számos emlős szövetben (DAWSON 1956, MARPLES és THOMPSON 1960), valamint néhány baktériumban. Az *E. coli*-ből izolált detergens-rezisztens foszfolipáz A egyaránt rendelkezik A₁ és A₂, valamint lizofoszfolipáz aktivitással, s így önálló foszfolipáz B-nek tekinthető (NISHIJIMA és mtsai 1977). ONO és NOJIMA (1969), valamint NISHIJIMA és mtsai (1974) *Mycobacterium phlei*-ből olyan membránhoz kötött foszfolipáz A₁-et izoláltak, amely nem pozícióspecifikus lizofoszfolipáz aktivitással is rendelkezik s ezáltal foszfolipáz B aktivitása van, szubsztrátspecifitása igen széles, a kardiolipint is hidrolizálja. Foszfolipáz B aktivitást találtak a *Penicillium notatum*-ban is (SAITO és KATES 1974). FEBRER (1966) a foszfolipáz B-t olyan „Sicherheitsenzym”-nek tekinti, amelynek a feleslegben levő membrántoxikus lizolecitin eliminálásában döntő szerepe van. Az önálló enzim léte azonban ma sem bizonyított. Feltételezhető, hogy a foszfolipáz B aktivitás a foszfolipáz A₁ és A₂ (LEHNINGER 1975) vagy a foszfolipáz A₂ és lizofoszfolipáz (ROMICS és SZOLLÁR 1977) keverékéből származik.

C típusú foszfolipázok

A jól ismert C típusú foszfolipázok baktériumokból származó extracelluláris enzimek. Sajátosságaik megállapítása mégsem könnyű, ugyanis az őket produkáló baktériumtörzsek egyéb extracelluláris toxinokat is termelnek, s ezek egyrészt maguk is aktivitást fejtenek ki a sejtmembránra, másrészt a foszfolipáz C hatásaival interferálhatnak. Szubsztrátspecifitásuk igen különböző, többnyire széles spektrumú (MÖLLBY 1978).

MACFARLANE és KNIGHT (1941) írta le, hogy a gázgangréna kórokozója a *Cl. welchii* (vagy *Clostridium perfringens*) toxinja lecitinázt tartalmaz, amely a lecitint foszfokolinra és digliceridre bontja, s ez azonos a specifikus α -toxinnal, amely letális, hemolitikus és nekrotikus hatással rendelkezik. Az enzim hőstabil, aktiválásához Ca⁺⁺ szükséges, jól gátolható fluoriddal, citráttal, foszfáttal s különösen *Cl. welchii* antitoxikus szérummal.

A *Cl. perfringens* ezen foszfolipáz C aktivitású α -toxinja volt az első ismert bakteriális foszfolipáz. Cink-metalloenzim (KURIOKA és MATSUDA 1976), a vörösvérsejtekre és más sejtekre a legaktívabban ható foszfolipáz, amely az

eukariotikus membránban található foszfolipidek legnagyobb hányadát bontani képes. Szubsztrátspecificitása széles, lecitinre, foszfatidil-etanolaminra, foszfatidil-serinre, szfingomielinre, valamint lizolecitinre és lizocefalinra terjed ki. Molekulasúlya gélfiltrációval meghatározva 30 000 körüli (MÖLLBY és WADSTRÖM 1973), más eljárásokkal mérve igen szórt értékeket kaptak.

A *Cl. perfringens* mellett a *Cl. novyi* (BARD és McCLUNG 1948), a *Cl. novyi* A típusa (MACFARLANE 1950), a *Cl. haemolyticum* (MACFARLANE 1950), *Cl. bifurmentans* (MILES és MILES 1950), és a *Cl. sordelli* (MACFARLANE 1948) képez extracelluláris toxinokat, amelyek egy része foszfolipáz C aktivitást mutat.

A *B. cereus* két, foszfatidil-kolint és foszfatidil-inozitolt hidrolizáló foszfolipáz C-je vált ismertebbé. Az előbbi cink-metalloenzim, molekulánként két Zn atomot tartalmaz, egyiket szorosabb, a másikat lazább kötésben (LITTLE és OTNAESS 1975). Aktiválásához Zn^{++} szükséges, de Ca^{++} nem befolyásolja működését (OTTOLENGHI 1965), az intakt humán vörösvérsejtekre nem fejt ki litikus hatást, s az élő sejtek foszfolipidjeit nem bontja. Gyors hemolízist okoz azonban, ha a rendszerhez szublitikus koncentrációban detergenst adnak (WOODWARD és ZWAAL 1972).

A foszfatidil-inozitolt hidrolizáló foszfolipáz C többnyire az állati sejtekben fordul elő, a baktériumokban csupán szórványosan található (ALLAN és MICHEL 1965, IKEZAWA és mtsai 1976). A *B. cereus* tenyészetének szűrletéből SLEIN és LOGAN (1965) mutatták ki, akik ún. „foszfatázémia-faktor” szerepet tulajdonítanak az enzimnek. Ez abban nyilvánul meg, hogy az enzim specifikusan, membránhoz kötött foszfatázt képes felszabadítani.

A humán patológiában nagy szerepet játszó *Staphylococcus aureus* szintén két foszfolipázt termel. Az egyik szfingomielin specifikus, ún. szfingomielináz C. A másik foszfatidol-inozitolt hidrolizáló foszfolipáz C.

A *Staphylococcus aureus* szfingomielináz C-je eredetileg mint lizolecitint is hasító enzim nyert leírást (DOERY és mtsai 1965). Igen erélyes hemolitikus tényező. A *Staphylococcus aureus* jelentős humán patológiai szerepe miatt széles körű tanulmányozást nyert. Molekulasúlya 20–38 000, működéséhez Mg^{++} szükséges, instabil, Mg -t tartalmazó bufferben tartható el liofilizálva. Az enzimet eredetileg WALBUM (1921) fedezte fel s a *Staphylococcus aureus* β -hemolizinjeként írta le. Sajátossága a birka vörösvérsejtek ún. „hot—cold” hemolízise. Ez abban jut kifejezésre, hogy a β -hemolizinnel, azaz szfingomielináz C-vel kezelt birka vörösvérsejtek 37 °C-on nem, de 4 °C-ra lehűtve igen gyorsan hemolizálódnak.

A *Staphylococcus aureus* foszfatidil-inozitolt hidrolizáló foszfolipáz C-je szűk szubsztrátspecificitással rendelkezik. Biológiai szerepe nem ismert, az enzim specifikus szubsztrátját, a foszfatidil-inozitolt ugyanis a staphylococcusok nem tartalmazzák. LOW és FINEAN (1977) — a *B. cereus* azonos enziméhez hasonlóan — alkalikus foszfatáz felszabadító hatását figyelte meg vese- és más emlős sejtekben.

Az *Acinetobacter calcoaceticus* extracelluláris hemolitikus hatású foszfolipáz C-t termel (LEHMANN 1971, 1972, 1973). Az ember és nyúl esetében direkt hemolitikus hatása van, míg a birkánál „hot—cold” reakciót vált ki. Gátolja a humán vörösvérsejt membrán ATPáz aktivitását (THELESTAM és MÖLLBY 1976).

Foszfolipáz C képzésére számos *Pseudomonas* törzs is képes. Közülük a legjelentősebb humán patológiai szerepe a *Pseudomonas aeruginosa*-nak van. Több toxinja között foszfolipáz C is található, de ezt még nem tisztították kellő mértékben, s patológiai hatásai sem ismertek eléggé. Feltételezik azonban, hogy a *Pseudomonas aeruginosa* okozta pneumóniákban a pulmonális surfactant destrúciójában van szerepe. ESSELMANN és LIU (1961) a *Pseudomonas aeruginosa* egyik szuperproduktív mutánsa tenyészetének szupernatánsából szokatlanul nagymennyiségű foszfolipáz C-t izolált. Feltűnő volt, hogy az enzim dialízálás révén aktivitását elvesztette, de a dializáló hártán belüli és kívüli folyadék összeöntése után az enzimaktivitás teljes mértékben visszatért. Az enzim két komponensből, egy 30 000-en felüli és egy 1000-en aluli molekulásúlyúból állt.

A C típusú foszfolipázok termelésére a Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumok hosszú sora képes. Az emlős sejtekben azonban közülük csupán a szfingomielináz C, valamint a foszfatidil-inozitol specifikus foszfolipáz C fordul elő.

D típusú foszfolipázok

A foszfolipáz D-t korábban kizárólag tisztán növényi enzimnek tekintették. A hetvenes évek elején azonban néhány emlős és bakteriális eredetű foszfolipáz D-t izoláltak (MÖLLBY 1978). Számos növényben megtalálható, káposztalevélben fedezték fel. Biológiai szerepe az észterifikált bázisok transzfer reakcióinak katalizálása. Izolálásukat és analizálásukat rossz oldékonyságuk akadályozza. STANACEY és STUHNE-SEKALEC (1970) kimutatta, hogy a káposzta foszfolipáz *in vitro* két molekula foszfatidil-glicerolból difoszfatidil-glicerolt — azaz kardiolipint — szintetizál, miközben melléktermékként egy molekula glicerint szabadul fel.

Először *Haemophilus parainfluenzae*-ben és *E. coli*-ban írták le a kardiolipin specifikus foszfolipáz D előfordulását (ONO és WHITE 1970). Később *Proteus vulgaris*-ban, *Salmonella typhimurium*-ban és *Pseudomonas aeruginosa*-ban is kimutatták. Az enzimnek a bakteriális sejt energetikai állapotváltozásában van szerepe. A baktériumban, nyugalmi állapotából az aktív, energia fogyasztó állapotba történő adaptációja során a kardiolipin abnormálisan magas nyugalmi szintje jelentékenyen csökken, a foszfatidil-glicerin alacsony szintje pedig a normálisra emelkedik (ONO és WHITE 1971).

HIRSCHBERG és KENNEDY (1972) a kardiolipin szintézist *in vivo*, az *E. coli*-ban is bizonyította. Ennek lehetőségét számos baktérium esetében már

korábban is feltételeztek. Azt a következtetést vonták le, hogy a legtöbb baktériumban a foszfolipáz D katalizálja a kardiolipin szintézist. Kiderült azonban, hogy gyakran a bioszintézis a foszfolipáz D legcsekélyebb nyoma nélkül zajlik le, s azt egy foszfolipáz D-hez hasonló hidrolitikus enzim katalizálja.

A *Corynebacterium ovis* (*pseudotuberculosis*) extracelluláris toxinjának — bakteriális eredete ellenére — szfingomielinre és lizolecitinre specifikus aktivitása van (SOUČEK és mtsai 1967, 1971). Az enzim letális és dermonekrotikus hatással rendelkezik, de nem hemolitikus, mint a *Cl. perfringens* α -toxinja vagy a *Staphylococcus aureus* β -toxinja, amelyek ugyancsak bontják a szfingomielinint. SOUČKOVA és SOUČEK (1972) vizsgálatai szerint annak ellenére, hogy a toxin viszonylag drasztikus elváltozásokat hoz létre a membrán-foszfolipidekben azáltal, hogy a membránban levő valamennyi szfingomielinint ceramidfoszfáttá hidrolizálja, a *Corynebacterium ovis* toxinjával történő inkubálás után a vörösvérsejtek nem mutatnak fokozott fragilitást más hemolitikus ágensekkel szemben, sőt ellenkezőleg: a *Staphylococcus aureus* α - és β -toxinjával, a *Clostridium perfringens* α -toxinjával, valamint az amboceptor mediált komplementtel szemben rezisztensnek bizonyulnak. E jelenség magyarázata az, hogy a foszfolipáz D úgy befolyásolja a szubsztrátot, a vörösvérsejt membrán szfingomielinjét, hogy ezáltal a membrán nem károsodik, de megszünteti annak fogékonyságát a szfingomielináz C-vel, a β -hemolizinnel szemben. A gátlás kompetitív.

Ezzel azonban nem magyarázható, hogy miért nem fejt ki hatását az előkezelt membrán: 1. a *Cl. perfringens* α -toxinja, amely a szfingomielin mellett lecitint és más foszfolipideket is hidrolizál, 2. a *Staphylococcus aureus* α -toxinja, amely nem a membrán-foszfolipidekre, hanem a glükoprotein receptorokra hat, s 3. miért marad el a komplement-mediált hemolízis. Mindez azzal magyarázható, hogy a membrán-szfingomielin hidrolízise a membrán megnövekedett negatív felületi töltését eredményezi, mivel a lehasított kolin pozitív töltésű, s így a membrán és a litikus ágensek közötti interakciók jelentősen megváltoznak.

További kérdés, hogyan okoz *in vivo*, kísérleti állatokon, letális hatást a foszfolipáz D, amely nem vált ki hemolízist és a fibroblaszt kultúrákban sem növeli a sejt-membrán permeabilitását. A letális hatásnak két magyarázata van. Az egyik szerint a kísérleti állatok a tüdő, máj és lép trombocita aggregáció okozta trombózisában pusztulnak el (SOUČOVA és SOUČEK 1972). A trombocita aggregációt a trombocita-membrán szfingomielinjének hidrolízise váltja ki. Ugyancsak a trombocita aggregációval magyarázható a toxin dermonekrotikus hatása is. A másik magyarázat szerint a foszfolipáz D hisztamin és más vasoaktív anyagot szabadít fel az állat heparinocitáiból (STRANDBERG és mtsai 1974). E jelenség az anafilaxiás shock patomechanizmusára emlékeztet.

A C típusú foszfolipázok alkalmazása a membránok vizsgálatában

Mivel a foszfolipidek a biológiai membránok alapstruktúráját képezik, a foszfolipázok rájuk gyakorolt specifikus hatása messzemenőig alkalmas a membránstruktúrák tanulmányozására. A leginkább vizsgált biológiai membrán az eritrocita-membrán. Ez érthető, hiszen emberben és állatban egyaránt a leghozzáférhetőbb sejtek az eritrociták. Az eritrocita-membrán hipotóniás — vagy egyéb — hemolízis révén centrifugálással könnyen előállítható, s nem kontaminálódik intracelluláris organellumokkal vagy membránfragmentumokkal. További egyszerű experimentális membrán-rendszerek nyerhetők a baktérium protoplasztok, szubcelluláris organellumok, a lizoszómák, a mitokondriumok és az endoplazmatikus vezikulák izolálásával.

A foszfolipán C-k legjobban kutatott citotoxikus hatása a hemolízis. Általában bakteriális eredetű, a *Cl. perfringens*-ből, a *B. cereus*-ből, a *Staphylococcus aureus*-ből és az *A. calcoaceticus*-ből származó foszfolipáz C enzimeket alkalmazzák a hemolízis vizsgálatára. Közvetlen összefüggés állapítható meg az enzimek hemolizálóképessége és szfingomielináz C aktivitása között.

A foszfolipázok által kiváltott hemolízis eredeti koncepciója nagyon egyszerű. Eszerint a foszfolipázok hidrolizálják a foszfolipideket, amelyek a membrán-mátrix fő permeabilitást szabályozó komponensei, s ezáltal durva membránkárosodás s a hemolízis jön létre. A kérdés azonban korántsem ilyen egyszerű. A Clostridiumok foszfolipáz C aktivitású hemolizinjének felfedezése után feltűnt, hogy a hasonló biokémiai sajátosságú foszfolipázok hemolizáló képessége jelentősen változik a különböző fajokból származó vörösvérsejtekkel szemben (OAKLEY és mtsai 1947, MILES és MILES 1950). A hemolízis vizsgálati kapcsán a kérdések sora vetődött fel:

- Mi az oka annak, hogy az ún. „hot—cold” hemolízis számos foszfolipázt jellemzi, mégis a *Staphylococcus aureus* szfingomielináz C-je esetében a legintenzívebb?
- Miért nincs hemolizáló képessége a *B-cereus* foszfolipázainak, amikor a foszfolipidek éppen olyan széles skáláját hidrolizálják, mint a specifikus szfingomielinázok?
- Mi az oka a különböző fajú vörösvérsejtek különböző érzékenységének?
- A hemolízist a membrán-foszfolipidek hidrolízise váltja-e ki, vagy a sejt-membrán vele született strukturális defektje eredményezi?

E kérdések megválaszolásához az eritrocita-membrán struktúrájára vonatkozó további vizsgálatokra volt szükség, amelyeket lényegében csak az utóbbi évtizedekben vihettek keresztül, mivel csupán újabban állnak rendelkezésre kellő tisztaságú foszfolipáz C preparátumok.

A *Staphylococcus aureus* β -toxinja (szfingomielináz C) által kiváltott „hot—cold” hemolízist GLENNY és STEVENS (1935) írta le elsőként. A jelenséget a *Cl. perfringens*, az *A. calcoaceticus* és a *P. aureofaciens* foszfolipáz C-i eseté-

ben is megfigyelték. A jelenség kapcsán a birka vörösvérsejtek csaknem valamennyi szfingomielinje leépült anélkül, hogy lízis következne be. Ilyenkor a szfingomielin-depletált membrán stabilitását a foszfolipidek és divalens ionok (főként Mg^{++}) közti interakciók biztosítják. A szfingomielin-depletált eritrociták azonban igen érzékennyé válnak a legkülönbözőbb ágensekkel szemben, így pl. más foszfolipázokra, a hőmérséklet csökkentésére, a kelát képző EDTA-ra (SHYTH és mtsai 1975), valamint a *Staphylococcus aureus* α - és δ -toxinjaira (MÖLLBY és mtsai 1976). E szinergetikus hemolitikus hatások érvényre jutására a természetes infekciók kapcsán is adódhat lehetőség.

A membrán-struktúra tisztított bakteriális foszfolipázokkal történő vizsgálatai révén meghatározták a humán eritrocita membrán-bilayerben a foszfolipidek megoszlását. A vizsgálatokhoz a *Staphylococcus aureus* vagy *B. cereus* foszfolipáz C-jének és sertés-pancreas vagy *Naja-naja* foszfolipáz A_2 -jének kombinációját használták, s a kombináció által létrejött szelektív hidrolízis révén megállapították a foszfolipidek aszimmetrikus disztribúcióját a membrán-bilayerben (ZWAAL és mtsai 1973). RORHMAN és LENARD (1977) más módszerekkel ugyanczen eredményre jutott.

További vizsgálatok kapcsán számos foszfolipid-aktív endogén enzimet találtak az eritrocita membránban. Foszfolipáz A-t, A_2 -t és C-t, lizofoszfolipázt, lipázt és diacilglicerol-kinázt mutattak ki (MÖLLBY 1978). Összefüggést észleltek a vörösvérsejtek metabolikus státusza és a foszfolipidjeinek bonthatósága között. GAZITT és mtsai (1976) a membrán-proteinek ATP általi foszfolilációját tanulmányozva szoros korrelációt találtak, egyrészt az ATP-depléció, másrészt a membrán-proteinek defoszforilációja, az intramembránális partikulumok aggregációja, a protein nélküli szabad lipid-bilayer viszonylagos növekedése és a foszfolipideknek a foszfolipázokkal szembeni akcesszibilitása között.

Ma is kevésbé ismert a foszfolipázok patogenezisben betöltött szerepe. Ezek az enzimek gyakran citolitikus hatással rendelkezvén hatást gyakorolhatnak a legtöbb sejtre, s az ún. „cél-sejtek” sejtmembránja foszfolipidjeinek csupán kismértékű károsítása is durva elváltozást eredményezhet a szervezet egészében. Az eddigi vizsgálatok alapján a hízósejtek, az idegsejtek, a trombociták és leukociták tekinthetők a vörösvérsejteken túlmenően ún. szenzitív „kulcssejtek”-nek. Fentiek alapján várható, hogy a foszfolipázok a jövőben minden bizonnyal nagyobb érdeklődést váltanak ki a membránnal és toxinnalógiával intenzívebben foglalkozó szakembereken túlmenően a patológusok és a klinikai szakmák művelői részéről is.

IRODALOM

1. ALLAN, D., MICHELL, R. H.: *Biochem. J.* **142**, 591 (1974).
2. ALLAN, D., MICHELL, R. H.: *Biochem. Soc. Trans.* **3**, 751 (1975).
3. AUGUSTYN, J. M., PARSIA, B., ELLIOTT, W. B.: *Biochim. biophys. Acta* **197**, 185 (1970).
4. BABB, R. C., McCLUNG, L. S.: *J. Bacteriol.* **56**, 665 (1948).
5. BJØNSTAD, P.: *Biochim. biophys. Acta* **116**, 500 (1966).

6. BLOOM, G. D., HAEGEOMARK, Ö.: *Acta physiol. scand.* **71**, 257 (1967).
7. CHAIN, E., DUTHIE, E. S.: *Brit. J. exp. Path.* **21**, 324 (1940).
8. CONTARDI, A., LATZER, P.: *Biochem. Z.* **197**, 222 (1928).
9. COOCK, A. M., LOW, E., ISHIJIMI, M.: *Nature* **239**, 150 (1972).
10. DANIELLI, J. F., DAVSON, H.: *J. Cell. Comp. Physiol.* **5**, 495 (1935).
11. DAWSON, R. M. C.: *Biochem. J.* **64**, 192 (1956).
12. DEENEN, L. L. M. van, de HAAS, G. H., HEEMSKERK, C. T. T.: *Biochim. biophys. Acta* **67**, 295 (1963).
13. DELEZENNE, C., LEDEPT, S.: *C. R. Soc. Biol. (Paris)* **71**, 121 (1911).
14. DELEZENNE, C., FOURNEAU, E.: *Bull. Soc. Chim. Fr.* **15**, 421 (1914).
15. DOERY, H. M., PEARSON, J. E.: *Biochem. J.* **92**, 599 (1963).
16. DOERY, H. M., MAGNUSSON, B. J., GULASEKHARAM, J., PEARSON, J. E.: *J. gen. Microbiol.* **40**, 283 (1965).
17. DOI, O., NOJIMA, S.: *J. Biol. Chem.* **250**, 5208 (1975).
18. ELSBACH, P., RIZAK, M. A.: *Amer. J. Physiol.* **205**, 1154 (1963).
19. EPSTEIN, B., SHAPIRO, B.: *Biochem. J.* **71**, 615 (1959).
20. ESSELMAN, M. T., LIU, P. V.: *J. bact.* **81**, 939 (1961).
21. FERBER, E.: *Diskussionsbeitrag*. in: R. HEISTEB, H. F. HOFMANN (ed.) *Die Entzündung. Urban und Schwarzenberg, München*, pp. 209–211 (1966).
22. FREDHOLM, B., HAEGERMARCK, Ö.: *Acta physiol. scand.* **71**, 357 (1967).
23. FREDRICKSON, D. S., LEVY, R. I., LEES, R. S.: *New Engl. J. Med.* **276**, **34**, **93**, **148**, **215**, **273**, (1967).
24. GALLAI-HATCHARD, J., MOGEE, W. L., THOMPSON, R. H. S., WEBSTER, G. R.: *J. Neurochem.* **9**, 545 (1962).
25. GATT, S., BAROENHLZ, Y., ROITMAN, A.: *Bioche. biophys. Res. Commun.* **24**, 169 (1966).
26. GAZIT, Y., LOYTER, A., REICHLER, Y., OAAD, I.: *Biochim. biophys. Acta* **419**, 479 (1976).
27. GLENNY, A. T., STEVENS, N. F.: *J. Path. Bact.* **40**, 201 (1935).
28. GORTER, E., GREDEL, F.: *J. Exp. Med.* **41**, 439 (1925).
29. HAAS, G. H. DE. SLOTBOOM, A. J., BONSEN, P. P. M. VON DEENEN, L. L. M., MAROUX S., PUIGSERVER, A., DESNUELLE, P.: *Biochim. biophys. Acta* **221**, 31 (1970).
30. HABERMANN, E.: *Naturwissenschaften* **41**, 429 (1954).
31. HABERMANN, E.: *Arch. Exper. Path. Pharmakol.* **125**, 158 (1955).
32. HABERMANN, E.: *Z. ges. exp. Med.* **129**, 436 (1958).
33. HABERMANN, E., SPRINGER, H.: *Naturwissenschaften* **45**, 133 (1958).
34. HABERMANN, E.: *Ergebn. Physiol. biol. Chemie. exper. Pharmak.* **60**, 221 (1968).
35. HABERMANN, E.: *Science* **177**, 314 (1972).
36. HANAHAN, D. J., WATTS, R. M., PAPPASJOHN, D.: *J. Lipid Res.* **1**, 421 (1960).
37. HAWINGER, J., HAWIGER, A., KOENIG, M. G.: *Yale J. Biol. Med.* **45**, 42 (1972).
38. HIRSCHBERG, C. B., KENNEDY, E. P.: *Proc. natn. Acad. Sci. USA.* **69**, 648 (1972).
39. IBRAHIM, S. A., THOMPSON, R. S. H.: *Biochim. biophys. Acta* **99**, 331 (1965).
40. IKEZAWA, H., YAMANEGI, M., TAGUCHI, R., MIYOSHITA, T., OHYABU, T.: *Biochim. biophys. Acta* **450**, 154 (1976).
41. JOSHUA, H., ISHAY, J.: *Acta Pharmacol. Toxicol.* **33**, 42 (1973).
42. KAWASAKI, N., SAITO, K.: *Biochim. biophys. Acta* **296**, 426 (1973).
43. KENT, C., LENARZ, W. J.: *Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A.* **69**, 2793 (1972).
44. KIRSCHMANN, C., ALOOF, S., DE VRIES, A.: *Thrombos. Diathes. haemorrh.* **9**, 512 (1963).
45. DE KRUYFF, B., DEMEL, R. A., VON, DEENEN, L. L. M.: *Biochim. biophys. Acta* **255**, 331 (1972).
46. KURIOKA, S., MATSUDA, M.: *Anal. Biochem.* **75**, 281 (1976).
47. LEHMANN, V.: *Acta path. microbiol. scand.* **79**, 61 (1971).
48. LEHMANN, V.: *Acta path. microbiol. scand.* **80**, 827 (1972).
49. LEHMANN, V.: *Acta path. microbiol. scand.* **81**, 419 (1973).
50. LENINGER, A. L.: *Biochemistry*. 2nd ed. Worth Publishers Inc. New York, pp. 290–291 (1975).
51. LEZIUS, A., MÜLLER-LORNSSEN, B.: *Hoppe Seylers Z. physiol. Chem.* **353**, 1872 (1972).
52. LITTLE, C., OTNAESS, A. B.: *Biochem. biophys. Acta* **391**, 326 (1975).
53. LIU, P. V.: *J. infect. Dis.* **116**, 112 (1966).
54. LOW, M. G., FINEAN, J. B.: *Biochem. J.* **162**, 235 (1977).
55. LUCY, J. A.: *Nature* **227**, 815 (1970).
56. MACFORLANE, M. G., KNIGHT, B. C. J. G.: *Biochem. J.* **35**, 884 (1941).
57. MACFORLANE, M. G.: *Biochem. J.* **42**, 590 (1948).
58. MACFORLANE, M. G.: *Biochem. J.* **47**, 267 (1950).

59. MAGEE, W. L., GALLAI-HATCHARD, J., SANDERS, H., THOMPSON, R. H. S.: *Biochem. J.* **83**, 17 (1962).
60. MARPLES, E. A., THOMPSON, R. H.: *Biochem. J.* **74**, 123 (1960).
61. MÉSZÁROS, I.: *Orv. Hetil.* **116**, 2703 (1975).
62. MÉSZÁROS, I.: *A Hymenoptera-ártalmak toxikológiája. Kandidátusi értekezés. Sümeg* (1976).
63. MILES, E. M., MILES, A. A.: *J. gen. Microbiol.* **4**, 22 (1950).
64. MÖLLBY, R., WADSTRÖM, T.: *Biochim. biophys. Acta* **321**, 569 (1973).
65. MÖLLBY, R., HOLME, T., NORD, C. E., SMYTH, C. J., WADSTRÖM, T.: *J. gen. Microbiol.* **96**, 137 (1976).
66. MÖLLBY, R.: *Bacterial phospholipases*. in: J. JELJASZEWICZ, T. Wadström (ed.) *Bacterial toxins and Cell Membranes*. Academic Press, London—New York—San Francisco pp. 367—424 (1978).
67. NEUMANN, W., HABERMANN, E., AMEND, G.: *Naturwissenschaften* **39**, 286 (1952).
68. NEUMANN, W., HABERMANN, E.: *Z. physiol. Chem.* **296**, 166 (1954).
69. NISHIJIMA, M., AKAMATSU, Y., NOJIMA, S.: *J. biol. Chem.* **249**, 5658 (1974).
70. NISHIJIMA, N., NAKAIKE, S., TAMORI, Y., NOJIMA, S.: *Eur. J. Biochem.* **73**, 115 (1977).
71. OAKLEY, C. L., WARRACK, G. H., CLARKE, P. H.: *J. gen. Microbiol.* **1**, 91 (1947).
72. ONO, Y., NOJIMA, S.: *Biochim. biophys. Acta* **176**, 111 (1969).
73. ONO, Y., WHITE, D. C.: *J. Bact.* **103**, 111 (1970).
74. ONO, Y., WHITE, D. C.: *J. Bact.* **108**, 1065 (1971).
75. OTTOLENGHI, A.: *J. Lipid Res.* **5**, 532 (1964).
76. OTTOLENGHI, A. C.: *Biochim. biophys. Acta* **106**, 510 (1965).
77. POOLE, A. R., HOWELL, J. I., LUCY, J. A.: *Nature* **227**, 810 (1970).
78. PUGH, D., CAWSON, R. A.: *Sabouraudia* **15**, 29 (1977).
79. RIMON, A., SHAPIRO, B.: *Biochem. J.* **71**, 620 (1959).
80. ROBERTSON, J. D.: *The molecular biology of cell membranes*. in: D. NACHMANSOHN (ed) *Molecular Biology*. Academic Press, London—New York pp 87—151 (1960).
81. ROBERTSON, A. F.: *Biochim. biophys. Acta* **116**, 379 (1966).
82. ROMICS, L., SZOLLÁR, L.: *Lipidek, lipoproteinek és hyperlipoproteinaemiák. Medicina Könyvkiadó, Budapest* p 66 (1977).
83. ROSSI, C. R., SARTORELLI, L., TATO, L., BARETTA, L., SILIPRANDI, N.: *Biochim. biophys. Acta* **98**, 205 (1965).
84. RATHMAN, J. E., LENARD, J.: *Science* **195**, 743 (1977).
85. ROTHSCHILD, A. M.: *Brit. J. Pharmacol.* **25**, 59 (1965).
86. SAITO, K., KATES, M.: *Biochim. biophys. Acta* **369**, 245 (1974).
87. SCHERPHOF, G. L., VON DEENEN, L. L. M.: *Biochim. biophys. Acta* **98**, 204 (1965).
88. SCHMIDT, G., BESSMAN, M. J., THANNHAUSER, S. J.: *Biochim. biophys. Acta* **23**, 127 (1957).
89. SINGER, S. J., NICOLSON, G. L.: *Science* **175**, 720 (1972).
90. SLEIN, M. W., LOGAN, G. F. Jr.: *J. Bact.* **90**, 69 (1965).
91. SMALL, D. M., RAPO, S.: *New Engl. J. Med.* **283**, 53 (1970).
92. SMYTH, C. J., FREER, J. H., ARBUTHNOTT, J. P.: *Biochim. biophys. Acta* **332**, 479 (1975).
93. SOUČEK, A., MICHALEC, C., SOUČKOVA, A.: *Biochim. biophys. Acta* **144**, 180 (1967).
94. SOUČEK, A., MICHALEC, C., SOUČKOVA, A.: *Biochim. biophys. Acta* **227**, 116 (1971).
95. SOUČKOVA, A., SOUČEK, A.: *Toxicon* **10**, 501 (1972).
96. STANACEY, N. Z., STUHNE-SEKALEC, L.: *Biochim. Biophys. Acta* **210**, 350 (1970).
97. STRANDBERG, K., MÖLLBY, R., WADSTRÖM, T.: *Toxicon* **12**, 199 (1974).
98. THELESTAM, M., MÖLLBY, R.: *Medical Biology* **54**, 39 (1976).
99. VÁZQUEZ-COLÓN, L., ELLIOTT, W. B.: *Toxicon* **4**, 61 (1966).
100. VOGEL, W. C., ZIEVE, L.: *J. Lipid Res.* **5**, 177 (1964).
101. WALBUM, L. E.: *C. r. Seanc. Soc. Biol.* **85**, 1205 (1921).
102. WEISSMANN, G., BECKER, B., THOMAS, L.: *J. Cell Biol.* **22**, 115 (1964).
103. WOODWARD, C. B., ZWAAL, R. F. A.: *Biochim. biophys. Acta* **274**, 272 (1972).
104. WUTHIER, R. E.: *Clin. Orthop.* **90**, 191 (1973).
105. ZIEVE, L., VOGEL, W. C.: *J. Lab. clin. Med.* **57**, 586 (1961).
106. ZWAAL, R. F. A., ROELOFSEN, B., COLLEY, C. M.: *Biochim. biophys. Acta* **300**, 159 (1973).