

A CITOMEMBRÁNOK ATPÁZ AKTIVITÁSÁNAK ELEKTRONMIKROSZKÓPOS HISZTOKÉMIAI VIZSGÁLATA

SÓTONYI PÉTER

Semmelweis Orvostudományi Egyetem Igazságügyi Orvostani Intézete, Budapest

Az elektronmikroszkópos hisztokémia jelentős szerepet tölt be különböző módszertani lehetőségek között a membránok ultrastrukturális elemzésében. A hisztokémiai eljárások alkalmasak a membránban vagy a membrán felszínén elhelyezkedő enzimek lokalizációjának *in situ* tanulmányozására. A membránhoz kötött enzimek vizsgálatával lehetővé vált a membrán strukturális organizáltságának morfológiai tanulmányozása. Az eljárás ma még kvalitatív esetleg szemiquantitatív következtetések levonására alkalmas, mégis a modern morfológiai lehetőségek egyik legperspektívikusabb eljárásának tűnik. A módszerek kétségtelen előnyökkel rendelkeznek, a szöveteket roncsoló, majd a sejtfrakciókat, enzimműködést izolált körülmények között vizsgáló biokémiai módszerekkel szemben. Az enzimműködés egy sor kölcsönhatás következményeként jön létre. A környezetből való kiragadással részben megszüntetjük azt a biokémiai vizsgálatok alkalmával.

Az *in situ* hisztokémiai eljárásoknál több módszertani probléma ma még megoldatlan, ezeknek figyelmen kívül hagyása a hisztokémiai reakció kivitelezésekor és értékelésekor az enzimműködés és lokalizáció vizsgálatát illetően helytelen következtetések levonását eredményezheti.

Az enzimműködés optimális feltételének és a szöveti struktúra épségének egymás melletti biztosítása külön-külön olyan követelményeket támaszt, melyek annyira ellentétesek, hogy csak optimális kompromisszum lehetséges. Az enzim hisztokémiai vizsgálatok kivitelezéséhez szükséges feltételek bizonyos fokig ellentmondásosak az ép sejtműködés körülményeihez viszonyítva, hiszen az intracelluláris reakció alapkövetelménye a sejt felületi membránjainak sértése. A működő sejt esetében ezzel szemben a membrán éppen a sejt oldott komponenseinek kiáramlását akadályozza meg. A hisztokémiai reakciónál azonban átjárhatóvá kell tenni, különböző kívülről bevitt anyagok számára. Az ATPáz esetében pl. ép körülmények között a sejtekben ATP nem jut be, a sikeres reakció alapkövetelménye a membrán szerkezeti átalakítása, részleges destrukciója. A hisztokémiai reakcióban az enzim kimutatására ma két lehetőség ismeretes, az egyik az enzimmolekula közvetlen meghatározása, a másik pedig az enzim által katalizált reakció felhasználása. Az előbbinél jelzett szubsztrát vagy gátló anyag autoradiográfiás eljárással történő lokali-

zálását használjuk fel. Az utóbbinál pedig a reakció végtermék az enzim működés során szubsztrát hasításból keletkezett nehéz fémmionnal lecsapott precipitátum, amit az enzim helyén próbálunk lokalizálni.

Az elmúlt években számos próbálkozás történt az ATPáz kimutatására, az egyes ATPáz félésegek eldifferenciálására, a vonatkozó eljárások problémájának összefoglalására, a módszerek használhatóságának tisztázására, melynek során ismereteink bővültek, a témakörben elvégzett munka jelentős. Ismereteink azonban ma még nem elegendőek ahhoz, hogy az enzimek helyét pontosan lokalizáljuk, a reakció specificitását határozottan bizonyosnak vegyük, ami kifejezésre jut abban, hogy az irodalmi adatok eredményei egymással többszörösen ellentmondóak. Az elmúlt évek kritikai jellegű vizsgálatai egyben megteremtették annak a feltételeit, hogy az eljárások specificitásának vizsgálatával részben elhárítsuk a metodikai nehézségeket és olyan módszereket próbáljunk kidolgozni, melyek az enzim valós helyét lokalizálják, illetve enzimműködés következményeként kialakult precipitátumot eredményezzenek.

Az ATPáz kimutatásának módszerei

A foszfatázék kimutatásának elméleti és gyakorlati alapjait GÖMÖRI (1939) és TAKAMATSU (1939) zseniális felfedezése fektette le. Az ATPáz kimutatásának módszertani feltételeit is ez az eljárás adta. Először GLICK (1945), GLICK—FISCHER (1946), majd NAIDO—PRATT (1951—52) PRATT (1953—54) dolgozott ki fémsós eljárást az enzim kimutatására. A ma használatos módszerek részben a WACHSTEIN—MEISEL (1957) ólomsós, részben pedig a HERMAN—PADYKULA (1955) kobaltsós eljárása. Az előbbinél az enzim reakció pH 7,2—7,4 között történik, a képződött anorganikus foszfátot az inkubáló oldatban levő ólomionnal csapjuk ki és a képződött ólomfoszfátot vizsgáljuk elektronmikroszkóppal. Az utóbbinál pH 9,0-nél történik reakció, ahol az anorganikus foszfátot először kalcium-foszfáttá alakítjuk, majd második lépésben kobalt-foszfáttá alakítva válik alkalmassá elektronmikroszkópos kimutatásra. A WACHSTEIN—MEISEL eljárás alapvető problémája az ólom részben enzimre, részben szubsztrátra kifejtett bénító, illetve hidrolizáló sajátsága. A HERMAN—PADYKULA eljárásnál a reakciótermék diffúziója miatt nehéz az enzim pontos helyének lokalizálása. Az elmúlt években számos próbálkozás történt a reakció specificitásának javítására, az inkubáló oldat komponenseinek koncentrációbeli változtatásával, ezek azonban nem oldották meg az alapvető, specificitást zavaró problémákat.

ERNST (1972) a membrán ATPáz kimutatására ATP helyett p-nitrofenilfoszfátot használt és az ólmot stronciummal helyettesítette. A képződött anorganikus foszfátot első lépésben stronciummal reagáltatta, majd a csapadék elektronszóró sajátságának növelése céljából ólom-foszfáttá alakította. Az eljárással kapcsolatosan megjelentek olyan közlések, melyek ezzel az eljárással

lényegesen specifikusabb, szelektívebb, és jobb lokalizációjú hisztokémiai csapadékot ismertetnek (GUTH—ALBERS 1974). A módszerrel kapcsolatban saját tapasztalataink nincsenek. Két tényezőt azonban nem lehet figyelmen kívül hagyni: a nem specifikus alkalikus foszfatáz azonos pH mellett hasítja a szubsztrátot (LUPPA és mtsai 1970, BUTTERWORTH 1971), a stroncium pedig a reakcióban alkalmazott magas koncentrációban már egyértelmű enzimgátlást hoz létre (BURT—GREEN 1971, MUSTAFA 1971, SOMOGYI 1968). A reakció problematikájával behatóan foglalkozott JANNIGAN (1973) és azt találta, hogy az aspecifikus reakció képződésének lehetősége ugyan olyan nagy, mint az ólom- vagy kobaltsós eljárásoknál. A kérdések egyértelmű tisztázása csak az eljárások széleskörű alkalmazása során nyert további tapasztalatokkal lehetséges. A mitokondriális ATPáz tanulmányozására új lehetőséget jelentett KERPEL—HAJÓS (1970) módszere, akik az ATP hasításhoz kötött divalens kation akkumulációt ($\text{Ca}^{2+} + \text{Sr}^{2+}$) mint a mitokondriális ATPáz indikátorát új hisztokémiai reakció kidolgozására alkalmazták.

A reakciók specifitásának javítását nagyban segítheti elő az enzim számára specifikus szubsztráttal vagy gátlóval történő vizsgálat, ezek azonban még nem egyértelműen keresztülvihető követelmények. Rendkívül perspektivikusnak látszik a későbbiekben részletezett elektronmikroszkópos autoradiográfiás eljárások bevezetése.

A szövetek előkezelésének és az inkubálás folyamatának néhány kérdése

A hisztokémiai reakciók kritikus kivitelezésének egyik alap követelménye, hogy tisztában legyünk azokkal a módszertani buktatókkal, melyek az anyag előkészítése során, illetve az inkubáció és az azt követő preparatív folyamatokban jelentkezhetnek. Ezek figyelmen kívül hagyása nem teszi lehetővé a kapott reakciók helyes értékelését. Szükségesnek látszik tehát a teljességre egyáltalán nem törekedve néhány alapvető, az inkubációt megelőző probléma érintése.

A szöveti struktúra post-mortem megőrzése, a szolubilis fehérjék oldhatatlanná tétele a kémiai fixálás feladata. Az ATPáz hisztokémiai kimutatásában a különböző aldehid származékok elsősorban glutáraldehid és formaldehid terjedtek el. A fixálók tulajdonságait részben a szövet struktúrára kifejtett megőrző hatása, részben pedig az enzim bénító hatásának mértéke együttesen határozzák meg. Az aldehid fixálók mind az —SH, mind pedig —NH² csoportokkal reakcióba lépnek, ezek azonban szükségesek az enzim aktivitáshoz. A kémiai rögzítés az enzim konformáció változását is gátolja, ami pl.: a transzport ATPáz kimutatásához szükséges. Általános irányelveként elfogadható az ATPáz kimutatásánál, hogy a kémiai fixálást kerülni kell. Az utóbbi években történtek olyan próbálkozások, amelyekben az enzimet szubsztráttal (ATP) előinkubáljuk, majd fixáljuk, ezzel az enzim szubsztrát

kapcsolattal védve a reaktív csoportokat. (KHAN és mtsai 1972a, b). A módszerrel kapcsolatos tapasztalatok azonban korántsem elégségesek ahhoz, hogy ezen eljárásnak valós értékeit megítélhessük. A fagyasztásos eljárás rögzített, vagy rögzítetlen fagyasztott metszeteken különböző típusú ATPáz kimutatására, lokalizálására kiterjedten alkalmazzák. Elsősorban azért tartják előnyösnek, mert a membrán szerkezetének fellazítása megkönnyíti az inkubáló oldat komponenseinek bejutását és a latens enzim aktiválódását eredményezi. A fagyasztásos eljárás azonban a sejteket súlyosan károsítja, ozmotikus sokkot hoz létre.

A hűtési sebességtől függően egyidejűleg különböző nagyságú, az extra- és intracelluláris térben képződő jégkristályok alakulnak ki, melyek felmelegítéskor növekedve a membránokat mechanikusan károsítják. A szabad víz kristályosodása az oldott anyagok, elsősorban elektrolitok koncentrációját hozza létre, a megnövekedett sókoncentráció miatt jelentősen változik a membrán permeabilitása is. A víz dehidratációs folyamata a fehérje—lipid komplexet károsítja. A fagyasztás kedvezőtlen hatásait próbálták csökkenteni a krioprotektív anyagok alkalmazásával. Hatásukhoz a szöveteket át kell itatni, ami nyilvánvalóan a sejt fiziológiás miliójét megváltoztatja. Az ATPáz esetében ezen anyagok alkalmazása már azért is meggondolandó, mert az enzimre direkt gátló hatást fejtenek ki (BAER—LATHE 1970, HEBER 1968, ZIMMY és mtsai 1972). Saját tapasztalataink szerint kedvezőbb eredményt, a kezeletlen blokk inkubált anyagon lehetett elérni, KERPEL—HAJÓS (1969) módszere alapján. Ennek előnyét abban is kiemelnénk, hogy a megfelelő blokk faragás eljárásával a különböző penetrációs zónák egymástól eldifferenciálhatók, és így vizsgálható az is, hogy az enzim aktivitás változása lokalizációbani eltérése, mennyiben lehet preparatív tényezők következménye. A preparatív tényezőkből adódó műtermék képződés lehetőségének nem ismerete, megfelelő kritikájú hisztokémiai reakciók kivitelezésére nem ad módot. Vizsgálatainkban a blokk felszínén kialakuló ólomesapadék mint azt GANOTE és mtsai (1968) észlelték, korántsem képeznek olyan nehézséget, amely a penetrációt gátolná, a módosított alacsonyabb ólomkoncentrációjú és ólom-komplexbéveket tartalmazó inkubáló oldat használatánál. Az inkubáló oldat összetevőinek helyes megválasztása döntően befolyásolja a hisztokémiai reakció sikerességét. Sikertelen reakció oka lehet pl.: az alábbiak figyelmen kívül hagyása. Alapkövetelmény friss szubsztrát használata, mert az ATP nem megfelelő tárolása vagy esetleg lefagyasztott ATP oldat alkalmazásánál a szubsztrát adenilsavra és pirofoszfátra bomlik. Nem elégséges az inkubáló oldat egyes komponenseinek pH ismerete, minden esetben az inkubálás megkezdése előtt be kell állítanunk az optimális pH-ra. Saját vizsgálatainkban legmegfelelőbbnek a cacodylat puffert találtuk. Az aminosav puffer a nehézfém-ionokkal, citrát puffer a magnéziumionokkal lép reakcióba, ami egyben ezen komponensek koncentrációváltozását is eredményezi. Alkalmazásuk saját tapasztá-

latunk alapján kerülendő. Az ólomsók közül az ólom-citrát és acetát finomabb szerkezetű reakció precipitátumot biztosított, így használatuk az ólomnitráttal szemben feltétlenül előnyben részesítendő.

Aktiválás és gátlás kérdése

Az egyenletes aktivitásban elhelyezkedő reakciótermék akkor használható, ha az szelektivitást mutat. Amennyiben ez nem áll fenn, úgy az aspecificitás bizonyítottnak vehető, miután minden sejtkomponensen előforduló enzim nem ismeretes. A diffúzió során a feltételezett enzim környezetében levő struktúrákon csapódik ki, pozitív, ill. negatív területek váltakoznak ugyanazon struktúrán. A specifikus gátlás az enzim helyén csökkenti, ill. megszünteti a reakciót, míg az aspecifikus helyen alig változtatja. A kérdést természetesen nehezíti az a tény, hogy bizonyos körülmények között endogén szubsztrát is fenntarthatja a reakciót, bár ez az ATPáz esetében nem jelent problémát. A gátló aspecifikusan kötődhet a szövetekhez, penetrációja lassúbb lehet a szubsztráténál és reakcióba léphet az inkubáló oldat összetevőivel. Természetesen specifikus aktiváló és gátlószer ismeretében az enzim vizsgálatának lehetőségei lényegesen kedvezőbbek lesznek. Mai ismereteink szerint a reakció a vizsgált ferment által katalizált folyamat eredménye akkor, ha szubsztrát nélküli kontroll és specifikusnak tartott gátló vegyületek során nem jelenik meg, ill. a specifikus aktiváló a reakció fokozódását eredményezi. Az alábbi táblázatban az egyes ATPáz típusok aktiválók és gátlók alkalmazásával kapott eredményeket szemléltetjük:

Típus	Aktiváló	Gátló	Hatástalan
Plazmamembrán-Na-K-ATPáz	Na ⁺ (K ⁺), Mg ²⁺	SH-blokkoló Quabain, Pb ²⁺ , Ca ²⁺ , foszfolipáz,	
Mg-ATPáz	Mg ²⁺ , Ca ²⁺	Sh-blokkoló Pb ²⁺	Na ⁺ , K ⁺ , Quabain
Szarkoplazmat. Ret. ATPáz	Mg ²⁺	SH-blokkoló Ca ²⁺ , Koffein	Quabain Na ⁺ , K ⁺
Mitokondr. ATPáz	Mg ²⁺ , Mn ²⁺ , Co ²⁺ , 2,4 Dinitrofenol	SH-blokkoló	Quabain
Miozin-ATPáz	Ca ²⁺ , Mg ²⁺	SH-blokkoló, Dinitrofenol	

Az elektronmikroszkópos hisztokémiában is döntő kérdés a lokalizáció vizsgálata. Ez a reakciós csapadék finomságának függvénye, általában amorf finom elosztású precipitátum egyenletes lerakódásban, magas elektronszórás-

sal kedvezőnek mondható, amennyiben kevesebb reakciótermék szükséges a láthatóvá tételhez, a lokalizáció irányában több információt kaphatunk. Jelenleg optimális körülmények között a fémsós eljárással membránszinten lokalizálható csapadékot nyerhetünk. A csapadék azonban általában fedí a struktúra részleteit még optimális körülmények között is, és ezért nagy az ellentmondás az enzim molekulamembránon belüli helyének lokalizálását célzó eredményekben. A kérdést nagyban zavarják olyan problémák, mint az enzim, az enzim hasítási termék és a végleges reakció termék diffúziója. A fémsónak a szövetekhez való affinitásából adódnak további nehézségek. Az optimális reakciótermék természetesen az, amely a megfelelő lokalizáció biztosítása mellett a szövetekhez csekély vagy ki nem mutatható affinitással rendelkezik (1–8. ábra).

A reakció specificitásának kérdése

Az ATPáz kimutatásával kapcsolatos kritikai vizsgálatok MOSES és mtsai (1967–1968–1969), ROSENTHAL és mtsai (1966–1969) nevéhez fűződik, ezek kétségessé tették az eredeti WACHSTEIN–MEISEL eljárás specificitását. Kritikai eredményeiket röviden az alábbiakban foglalhatjuk össze:

1. Az ólom erősen gátolja az Mg–ATP-ázt és részletesen a Na–K–ATP-ázt.

2. Az ólom létrehozza az ATP nem enzimátikus hasítását, amit műtermék képződéséhez vezet.

3. A reakciócsapadék precipitált nukleotidokat tartalmaz az ólom és foszfát mellett.

4. Az inkubáló oldat komponensei egymással reagálnak, annak összetételét, koncentrációját és reakciótermék képződésének változását eredményezik.

5. A nem enzimátikus ATP hasítás során keletkezett termék hasonló helyen csapódik le, mint az enzimátikus hidrolízis során létrejött reakció csapadék.

6. A gátlószerek a szövetek ólomaffinitását csökkentik, ez aspecificus reakció kiesésének oka lehet.

NOVIKOFF (1967, 1970a, b), HORI (1968) és ODA (1965) az eredeti eljárást specifikusnak tartják és a kritikai észlelésekkel szemben felhozott, nem meggyőző ellenérveik a következők:

a) A plazmamebránon csak ATP alkalmazásával jön létre reakció. ADP nem alkalmazható, noha az ólom által létrejövő hasítás a különböző szubsztátok esetében kialakul.

b) Néhány nukleotidfoszfát használható mint szubsztrát, melyeknél azonban a nem enzimátikus hidrolízis nem a plazmamembránon, hanem az endoplazmatikus retikulumokban alakul ki.

c) A hisztokémiai reakció függvénye a hőmérsékletnek, abban az intervallumban, melyben a nem enzimatis hidrolízis alacsony, az enzimműködés feltételei nem optimálisak.

d) A specifikus gátlószerek az aspecifikus ATP hasítást nem gátolják.

e) A nem enzimatis ATP hasítás nem szignifikáns, független az oldat ATP és ólom koncentrációjától.

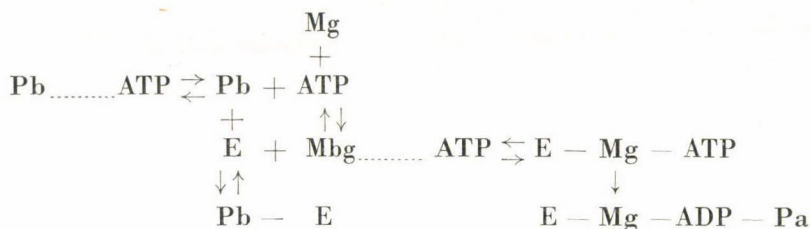
f) A nem enzimatis működés következményeként kialakult precipitátum tulajdonságai eltérőek.

Saját vizsgálataink tapasztalatai alapján a fenti ellenérvek korántsem bizonyítanak a WACHSTEIN–MEISEL eljárás specificitása mellett. Az egyes kérdések részletezése nélkül, azonban szükséges foglalkoznunk az ólomnak a szövetekhez való aspecifikus kötődésének kérdésével, a metallofilia jelenségével, amit véleményünk szerint sokkal kevésbé vesszünk figyelembe, mint amit annak jelentősége megkívánna (9–16. ábra). Az ólom és vegyületei a szövetek reaktív csoportjaival kémiai reakcióba lépnek. Az ólom és az anion között egyszerű sókötés alakul ki, de létrejöhet komplex kötés, elsősorban savanyú pH-nál az –SH csoportokkal. Alkalikus pH-nál karbonát, hidroxid csoportokkal alkot oldhatatlan csapadékot (DEIMLING 1964, STADTHOUDERS 1966). Az elektronmikroszkópos preparatív technikával használt ólom kontrasztosznál lúgos pH mellett különböző ólomvegyületeket mint nitrát, acetát, hidroxid, citrát alkalmazunk (DALTON 1960, KARNOVSKY 1961, MILLONIG 1961, REYNOLDS 1963, WATSON 1958). A szövet kontrasztoszthatósága tulajdonképpen az ólom és reaktív csoportok kapcsolataként jön létre. ROSTGARD–BARNETT (1965) 4 mM-os ólom-nitrát oldattal történő szövetinkubálásnál kifejezett ólomprecipitációt talált bélhámsejtek bolyhainak felszínén, lipid partikulumokon.

CSILLIK–DAVIS (1964). 0,1%-os ólomnitrát kezelés után harántcsíkolt izom poszt-, ill. preszinaptikus sejtmembránján talált aspecifikus csapadékot. Erősen lúgos pH-nál BEHNKE (1966) jellegzetesnek mondható miofilamentum ólom affinitást észlelt. Hasonló megfigyeléseket tett GILLIS–PAGE (1967). A WACHSTEIN–MEISEL eljárásnál az ólomvegyület egyszerűen adszorbeálódhat a sejt felszínre, de az inkubáló oldatban a szubsztrát ólom aktivált bontása által képződött ólomfoszfát is lecsapódhat. A kritikai vizsgálatok több ponton adatokat szolgáltatottak a hisztokémiai reakció menetét illetően, az lényegesen bonyolultabb, mint korábban gondoltuk. A korábbi elképzelés szerint a hisztokémiai reakció menete a következő:



BERG (1964), TICE (1968, 1969a, b) vizsgálataiból egyértelműen a reakció lényege sokkal komplexebb:

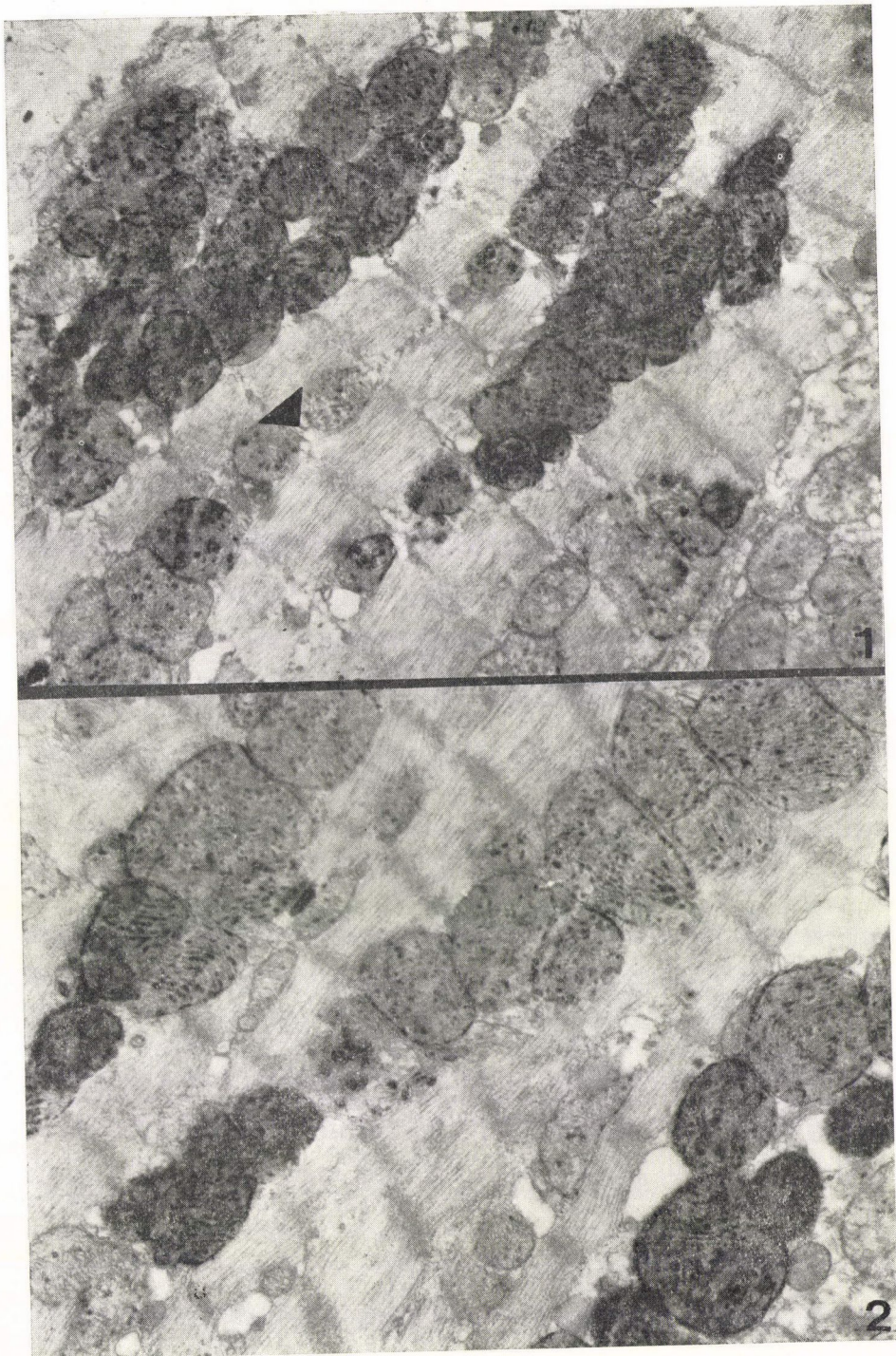


A reakcióegyenletről kitűnik, hogy az ólom nem szabad formában van jelen, hanem komplexet alkot az inkubáló oldat komponenseivel, így az ólom és ATP kelátot képez, nem ismeretes, hogy ezt ugyanolyan intenzitással képes-e hasítani az enzim, mint az ATP-t. Ugyanakkor az ólom mint kompetitív gátló szerepel. Az enzimmel való kapcsolata abban jut kifejezésre, hogy az ATP-vel az enzim aktív centrumáért, az —SH csoportért is konkurrál. A reakció menetének megértésében jelentős lépést jelentettek azok a vizsgálatok, melyek a hisztokémiai csapadék szerkezeti analízisét tűzték ki célul. Az egyik lehetőség a hisztokémiai csapadék kivonása és annak kémiai analízise, ez azonban egyben lokalizáció feláldozását is jelentette. Az elektrondiffrakciós módszer adta lehetőségek sokkal perspektívikusabbnak látszanak, mert a szöveti szerkezet megbontása nélkül teszik lehetővé a hisztokémiai csapadék tanulmányozását.

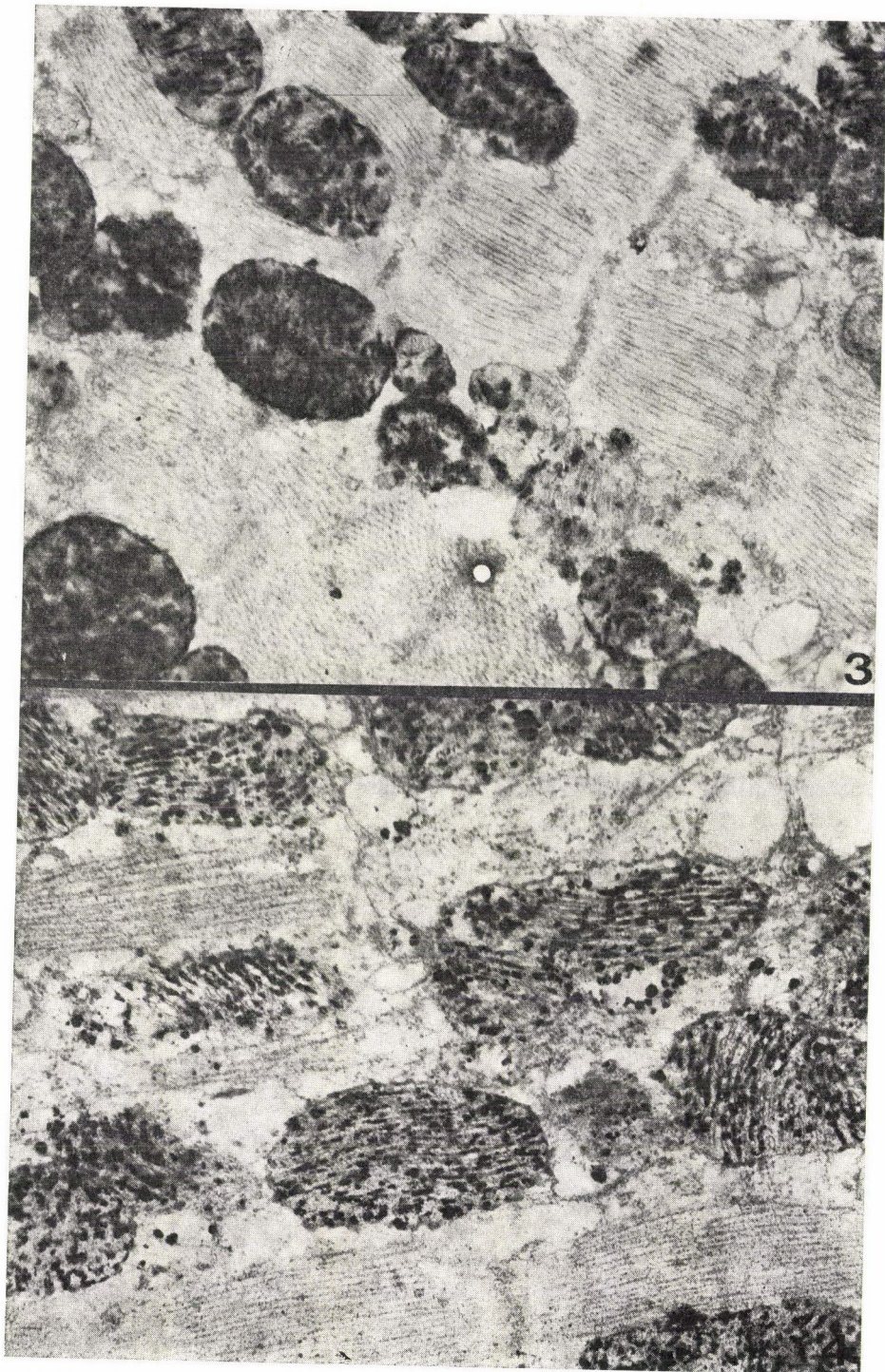
A mikroszondával végzett vizsgálatok (EDAX: Energy Dispersiv Analysis of X-Rays) azt mutatták, hogy a csapadék szerkezete összetett. A felszínre adszorbeálódó csapadék bizonyítéka, hogy az az ólom mellett más vegyületet nem tartalmaz. Az inkubáló oldatból szubsztrát nélkül az ólom részben a szöveti foszfát, részben pedig kén csoportokkal lép reakcióba, oly módon, hogy a csapadékban mindhárom komponens együttesen jelen lehet. Abban az esetben, ha az —SH csoportokat megelőzően blokkoljuk, akkor nemcsak a hisztokémiai reakcióhoz szükséges —SH csoportokat gátoljuk, hanem az aspecifikus ólomkötődés lehetőségét is jelentősen csökkentjük, kérdéses tehát ilyen esetekben az SH blokkolás mennyire használható, mint kontroll. A hisztokémiai csapadék szerkezeti analízise, ha abban ólom-foszfát van jelen, enzim reakciónál és műtermék reakciónál ugyanazt a képet mutatja (17–20. ábra). A hisztokémiai reakciócsapadék szerkezeti analízisének lehetősége egyben módszer is az aspecifikus reakció kimutatására, képződésének további vizsgálatára (SÓTONYI és mtsai 1973).

A hisztokémiai reakció specificitásának javítási lehetőségei

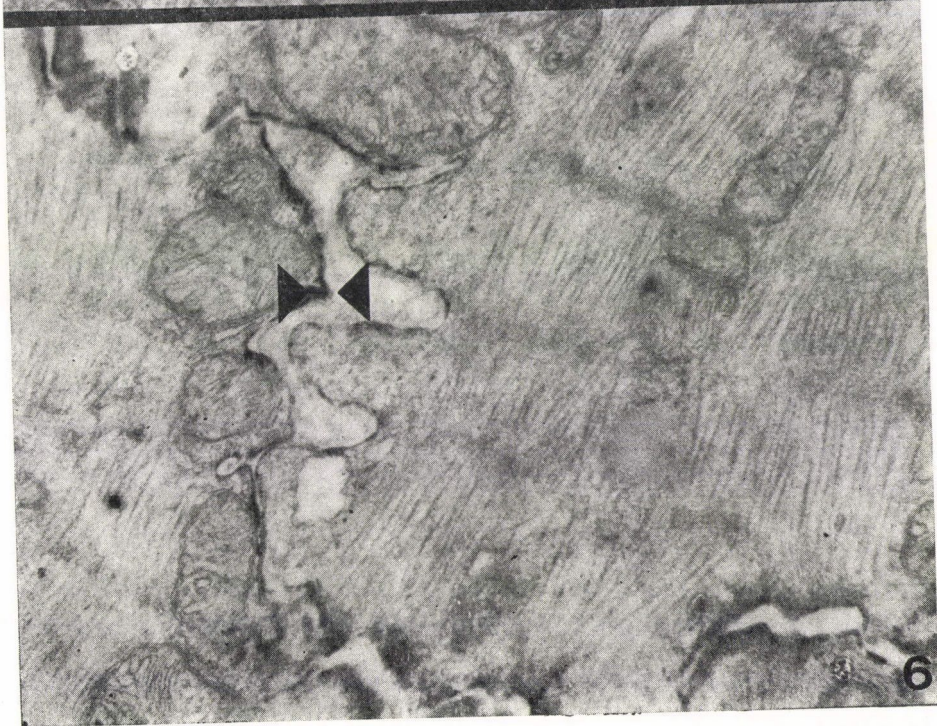
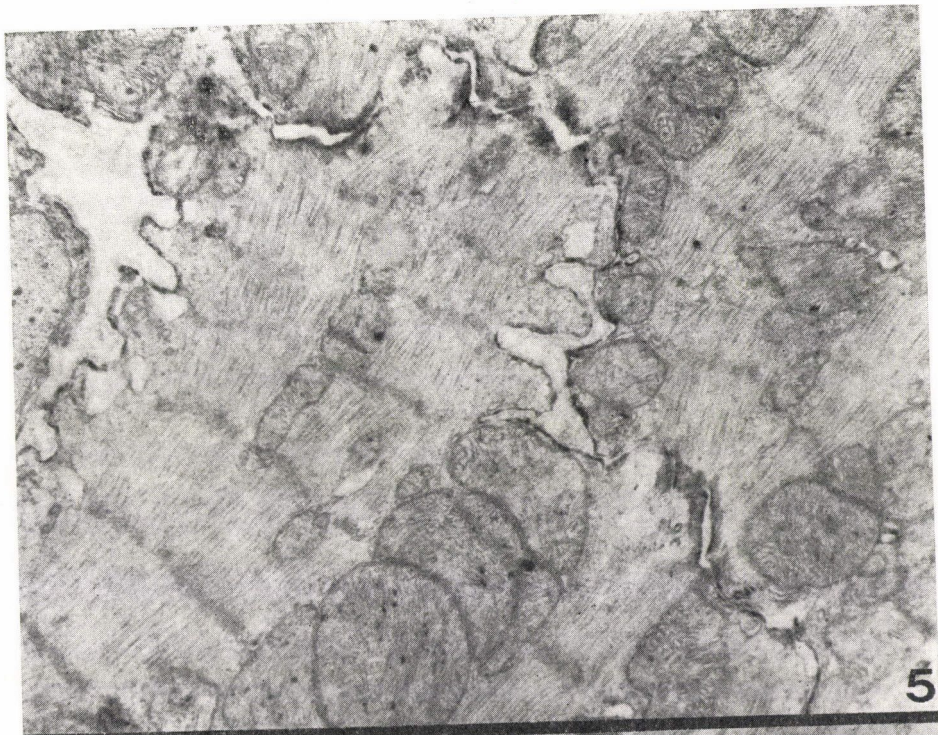
Az ATPáz kimutatásával kapcsolatos kritikai vizsgálatok szükségessé tették az eredeti eljárás módosítását. A korábbi próbálkozások elsősorban az inkubáló oldat komponenseinek változtatásait érintették, úgymint ólomkoncentráció csökkentése, más puffer használata, ATP koncentráció emelése.



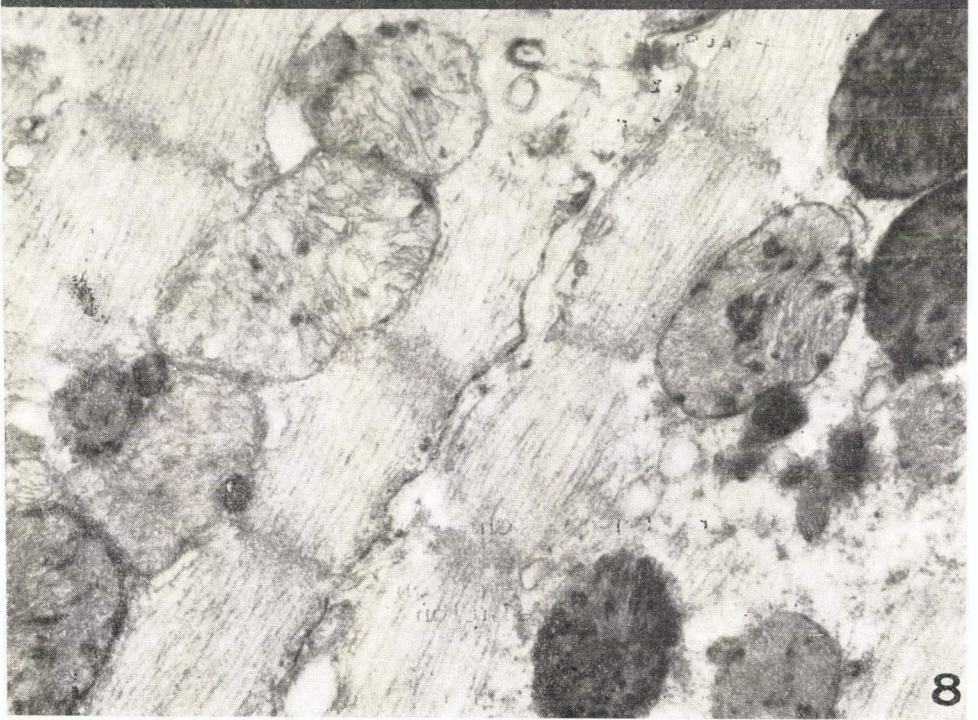
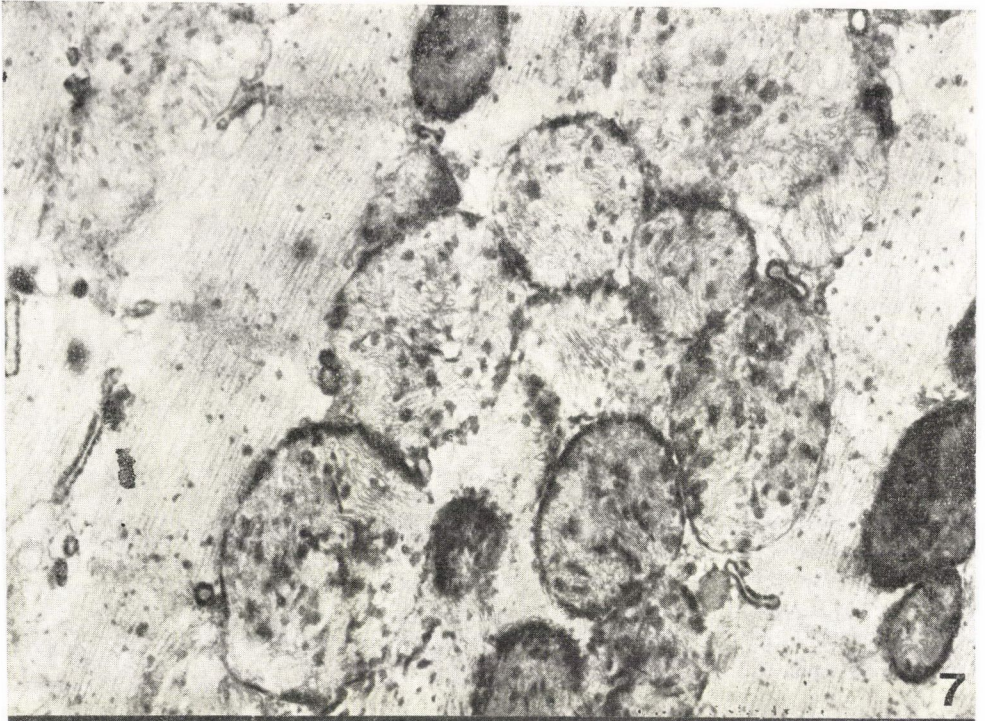
1—2. ábra. Mitokondriális ATPáz különböző nagyítású felvételein jellegzetes lokalizáció látható. Az aktivitás azonban eltérő, pozitív mitokondriumok között negatív is előfordul



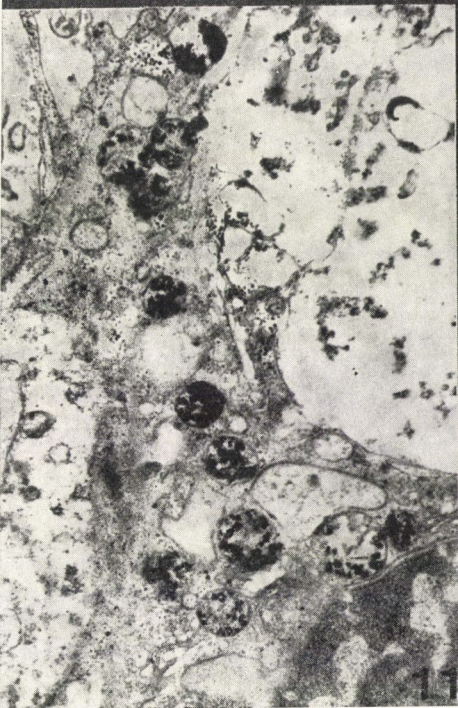
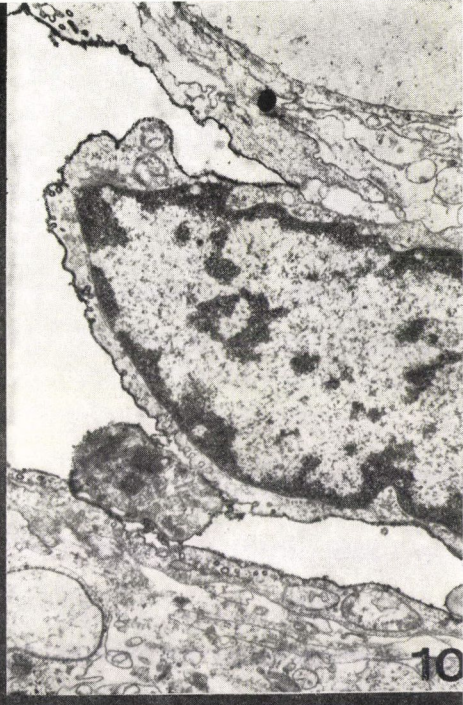
3. ábra. A mitokondriális enzimaktivitás 2–4. dinitrofenol hozzáadásával emelkedik
4. ábra. Kobalt-nitrát alkalmazásával, a kapott csapadék az ólom-nitráthoz viszonyítva szelektív
vebb reakciót mutat



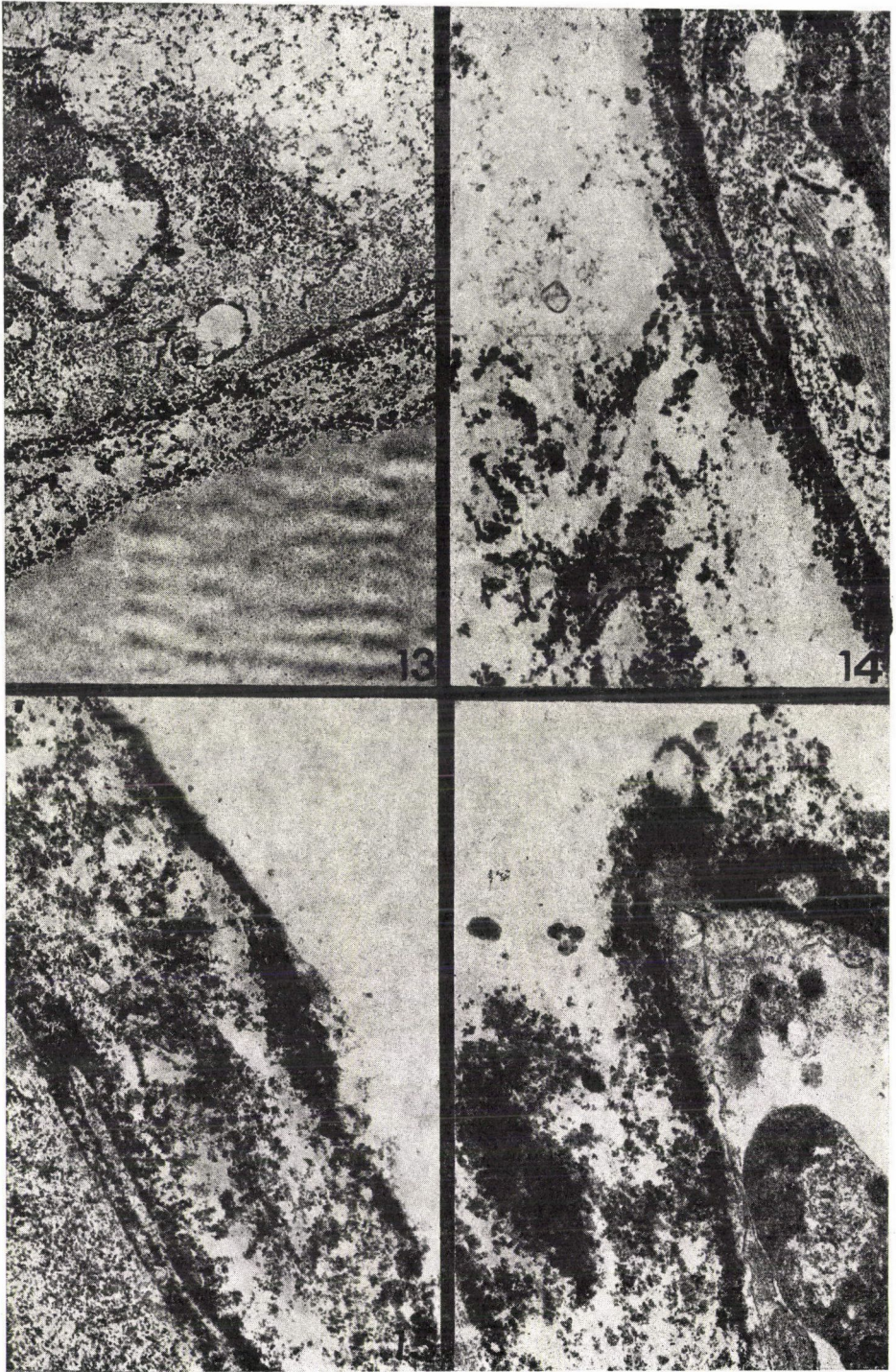
5—6. ábra. A transzport ATPáz lokalizációját mutatja, a nagyobb nagyítású felvételen a szarkolemma membránon belüli lokalizáció is megítélhető



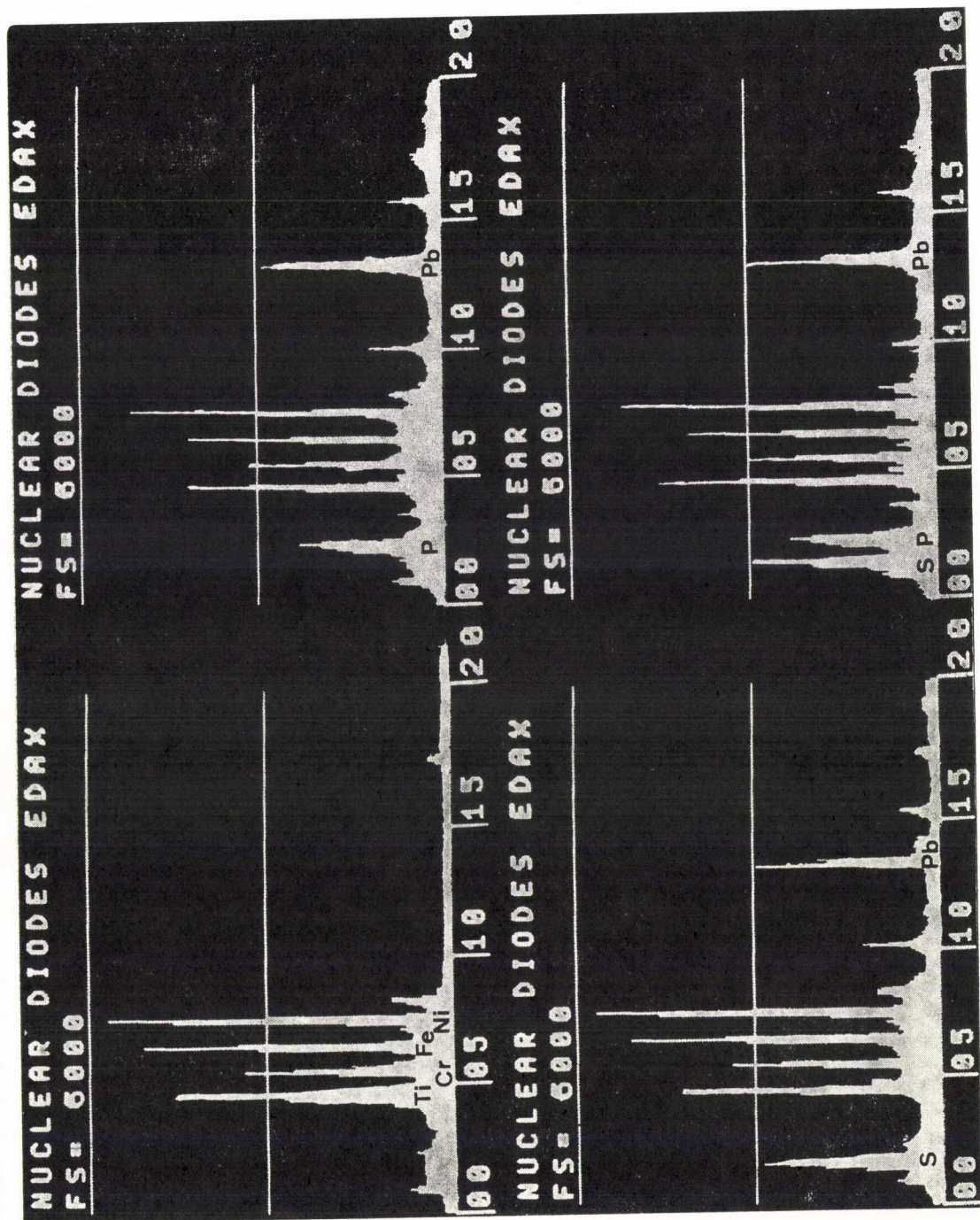
7—8. ábra. Transzport ATPáz magnézium jelenlétében történő kimutatásánál a mitokondriumokon szarkotubuláris szisztémában is reakció jelenik meg



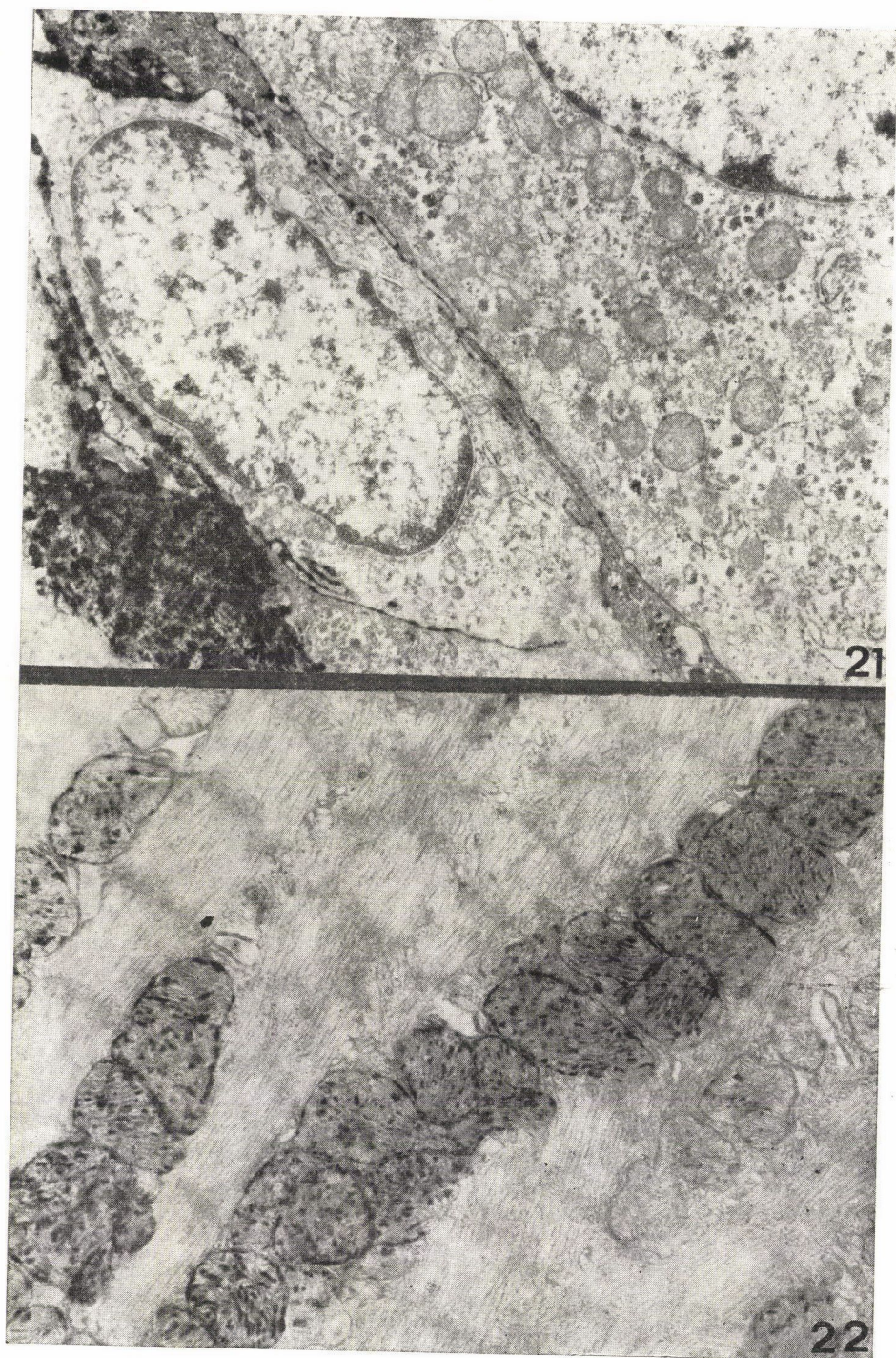
9–12. ábra. Aspecifikus reakció látható részben sejtfelszíneken, lizozomán, illetve mielin hüvelyen



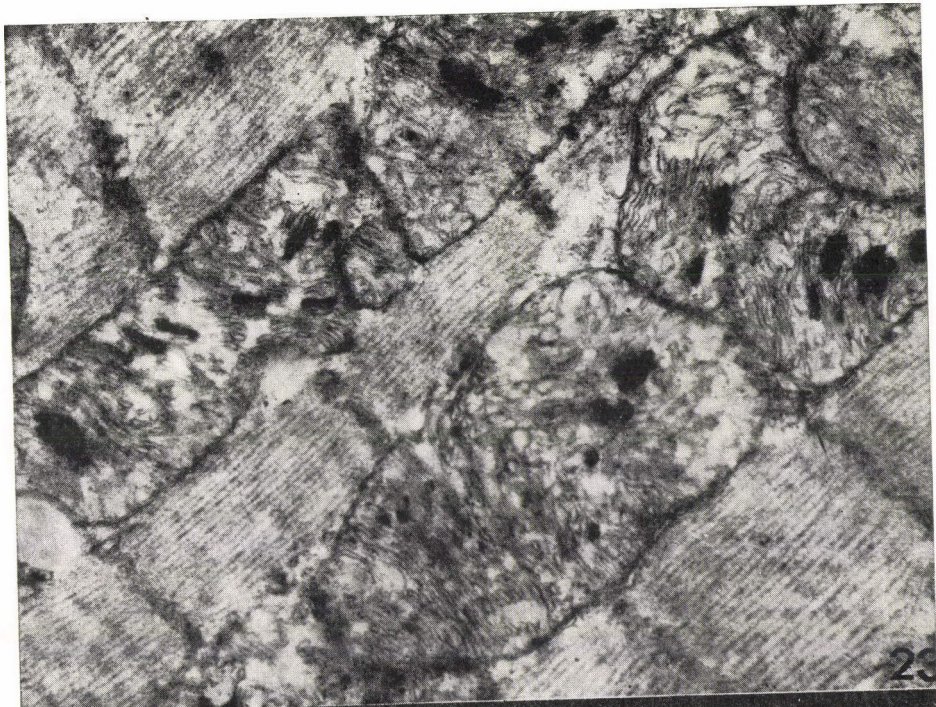
13—16. ábra. Aspecifikus ólom kötődés során kialakult reakció, szubsztrát nélküli inkubálásnál.



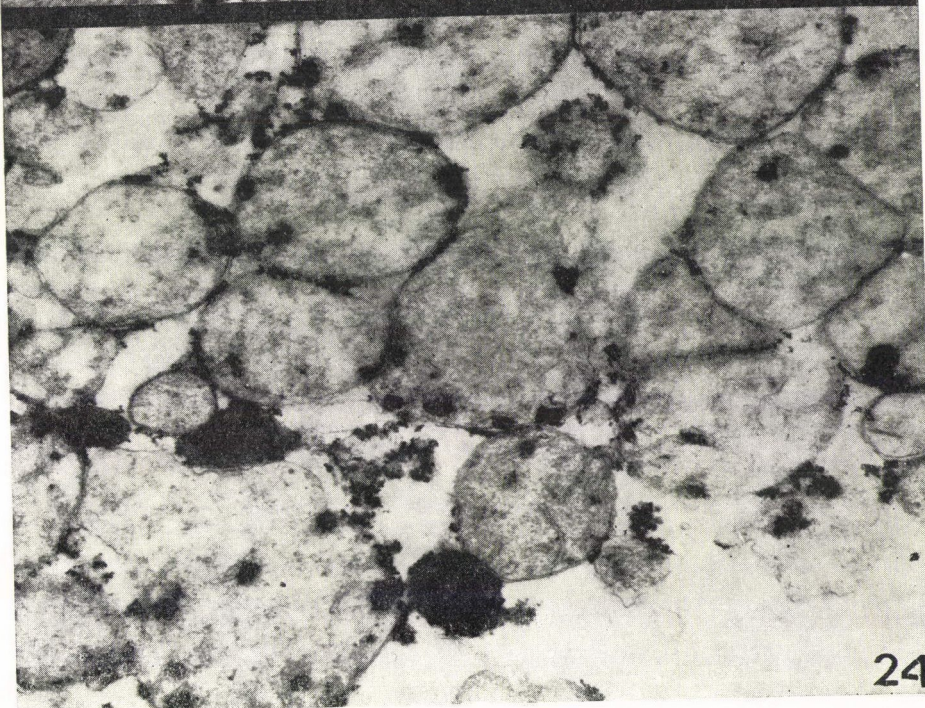
17–20. ábra. Mikroszondával végzett vizsgálatok a reakcióspadék szerkezeti analízisének eredményeit mutatják



21—22. ábra. Máj és szívizom ATPáz reakciója neodimium-nitráttal

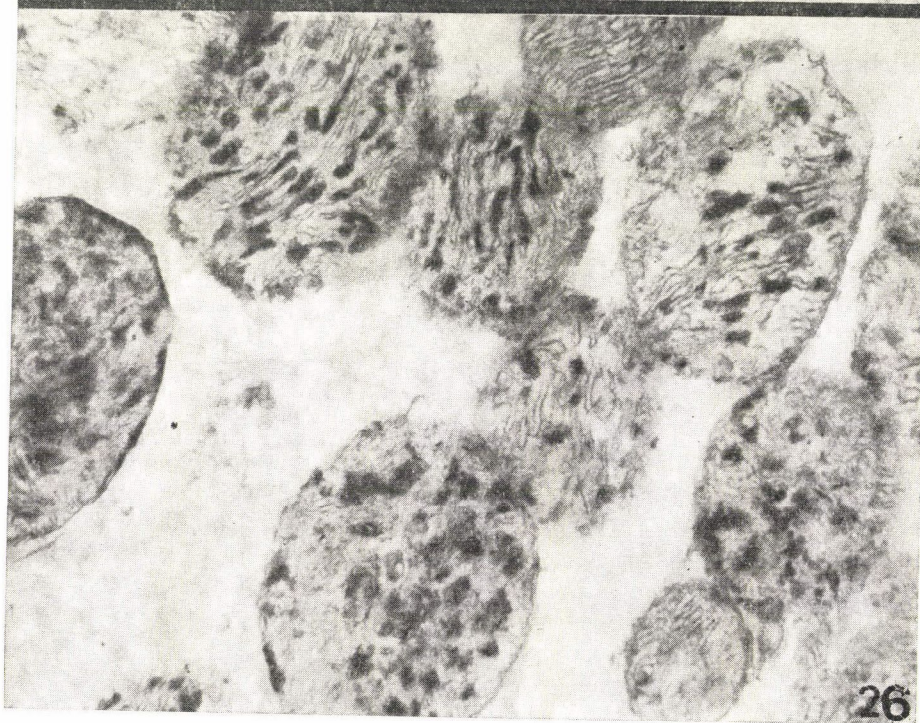
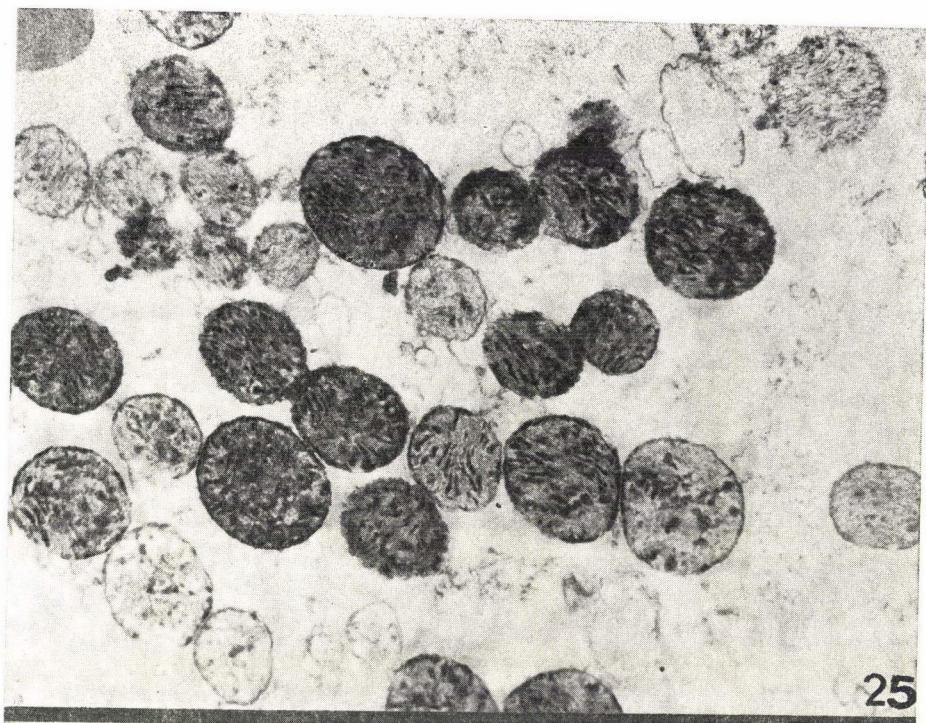


23



24

23—24. ábra. Divalens-kation akkumuláció módszerének alkalmazása in situ és izolált mitokondriumokon



25–26. ábra. Izolált mitokondrium ATPáz reakció. A csapadék jó lokalizációt biztosít

Ezekkel a módosításokkal kétségtelenül javítani lehetett a reakció lokalizációját, specificitását (JACOBSEN—JÖÖRGENSEN 1969, SOMOGYI—SÓTONYI 1969—1970—1971, SCHULZE—WOLLENBERGER 1965—1967). A továbbiakban azokkal a lehetőségekkel foglalkozunk, melyek leginkább alkalmasak megítélésünk szerint az ólom problematikus tulajdonságainak kiküszöbölésére.

Az ólom reakcióját az inkubáló oldat különböző komponenseivel kelátképző anyagok hozzáadásával akadályozhatjuk meg. Ezek az ólom reakcióját jelentősen csökkentik, adott esetben megszüntetik. A kelátképzők koordinatív kötést alkotva az inkubáló oldat ólom ionjaival jelentősen csökkentik annak szabad ionkoncentrációját. A kelátor—ólom reakció egyensúlyi állapot kialakulásához vezet. Az ólom koncentráció elsősorban a kelát—fémion iránti affinitástól függ, de befolyásolják olyan tényezők is, mint pH és az oldat egyéb komponensei. Az ólom-kelátképző komplex stabilitása rendkívül fontos, legalább olyan erősnek kell lennie, hogy megakadályozza az ólom kicsapódását, de ne gátolja az ólom-foszfát képződését. A kelátképző az ólom jelentős részét megkötve tartja, azonban optimális esetben a felszabaduló anorganikus foszfát megkötéséhez szükséges ólmot a komplex szabaddá teszi. Az inkubáló oldat ólomkoncentrációja tehát a reakció menete alatt egy konstans szinten marad, és a médiumban egyensúlyi állapotban van. A kelátor használhatóságát tehát az egyensúlyi állapot gyorsaságának kialakulása is jelzi. Fontos, hogy ez ne az ólom-komplex képződés irányában tolódjon el, mert így az ólom aktuális koncentrációja olyan alacsony lesz, hogy nem jön létre az enzimatikusan felszabadított anorganikus foszfát kicsapása. A lokalizáció helyessége pedig döntően függ attól, hogy az ólom-foszfát képződése elég gyors legyen ahhoz, hogy eldiffundálás előtt kicsapja és biztosítsa a reakció menetét, az ólom-foszfát folyamatos képződését. Ha az ólom-foszfát képződés feltételei megvannak, akkor a reakció során az oldatból kicsapódó ólom-foszfát pótlására a hisztokémiiai reakció alatt az ólom folyamatos pótlására biztosított a kelát lebontása.

Az alkalmazott kelátorok mellett különösen az L-aszkorbinsav és g-penicillinamin látszott alkalmasnak a már használt kálium-nátrium tartarát és tiron mellett. Ezen vegyületek alkalmazásával csökkenthető az aspecifikus reakcióképződés lehetősége, azonban számításba kell vennünk azt, hogy ezek közül az L-aszkorbinsav pl. a membrán ATPázra gátló hatást fejt ki, a kálium-nátrium-tartarát a foszfát csoportokkal lép reakcióba, így használatuk esetenként az ATPáz típusától függő.

Az ólom elsősorban ólom-nitrát helyettesítése ólom acetáttal, citráttal, vagy kobalt nitráttal kezdetben úgy tűnt jelentősen csökken az aspecifikus reakció lehetősége, szelektívebb lokalizációt biztosítanak. Az utánvizsgálatok azonban ezt nem bizonyították egyértelműen, más nehézfém ionok, mint pl. kadmium, bárium és ezüst kerültek alkalmazásra, jelentősen azonban e probléma megoldásában előrelépést ezek sem hoztak.

SZINAY (1967) vizsgálataiban megállapította, hogy a ritka földfémek

szérum-glikoproteinekkal nagy molekulású komplexeket hoznak létre. Ezek közül különösen a neodímium és vegyületei alkalmasak. Az alkalmazott koncentrációtól függően a neodímium glikoprotein komplex részben tárolódik, részben pedig extracellulárisan lerakódik. Az anyag elektronmikroszkópos vizsgálattal annak rendkívül magas elektronszóró sajátsága miatt jól tanulmányozható, és feltűnő, hogy a reakció precipitátum finom szerkezetű. Az anyagot munkatársaival együtt különböző tárolási folyamatok vizsgálatánál eredményesen alkalmazta.

A ritka földfémek csoportjába tartozó vegyületek közül elsősorban neodímium-nitrát mutatott kedvező tulajdonságokat, mert a hisztokémiai reakcióhoz szükséges koncentrációban az ATP spontán hasítását nem hozza létre, ill. az enzimet nem bénítja (SÓTONYI és mtsai 1974). A reakciócsapadék szelektívnek tűnő jó lokalizációt mutat és megfelelő elektronszóró sajátsággal is bír. A vegyület alkalmazása, tulajdonságainak további vizsgálata nagyon is perspektivikus (21–22. ábra).

A KERPEL—HAJÓS (1970) közölt divalens kation akkumulációs eljárásával kedvező eredményeket értünk el a mitokondriális ATPáz esetében. Az aktiváló és gátló anyagok tulajdonságait jól vizsgálhattuk. A preparatív tényezők miatt, pl. a mitokondriumok extrém duzzadása alakul ki, ami a lokalizáció megítélését nagyban nehezíti. Ez a probléma azonban izolált körülmények között jelentkezett, míg *in situ* anyagban alig zavarta a lokalizáció értékelését. Az eljárás kiterjedtebb alkalmazása feltétlenül indokolt, hiszen az ólom kedvezőtlen hatásait teljesen kiküszöbölhetjük. Az általuk alkalmazott koncentrációnál nem kell számolnunk pl. a stroncium enzim blokkoló sajátságaival sem (23–24. ábra).

Új lehetőségeket jelent az elektronmikroszkópos autoradiográfia enzim hisztokémiai alkalmazása, melynek során jelzett gátlóval vagy szubsztráttal próbáljuk meghatározni az enzim helyét, a szubsztrát mozgásának irányát (OSTROWSKI 1963, OSTROWSKI 1970, 1972, SÓTONYI 1972). Az enzimre specifikus szubsztrát és gátló használatával illetve ilyen vegyületek ismeretével nagyon perspektivikussá válik ennek az eljárásnak enzim hisztokémiai alkalmazása.

A lokalizáció vizsgálatára izolált membrán, mitokondrium frakciókon végzett reakciók nagyon értékes eredményeket adnak (25–26. ábra).

Az ATPáz elektronmikroszkópos hisztokémiai kimutatásában számos megoldatlan probléma van. Éppen ezekre tekintettel nagy körültekintést igényel az eljárások alkalmazása során a kapott eredmények értékelése. A nagyszámú kritikus vizsgálat arra is felhívta a figyelmet, hogy a buktatók ellenére a hisztokémiai eljárások módszertani időszakában a specifikus eljárások kidolgozása az elsődleges feladat.

IRODALOM

1. BAXTER, S. I., LATHE, G. H.: Biochemical effects of kidney of exposure to high concentrations of DMSO. *Biochemical. Pharmacol.* **20**, 1079 (1971).
2. BENHKE, O.: Nonspecific deposition of lead in experiments on fine structural localization of enzymatic activity of rat blood platelets. *J. Histochem. Cytochem.* **14**, 432 (1966).
3. BERG, G. G.: The staining of triphosphatases by the chelate removal method. *J. Histochem. Cytochem.* **12**, 341 (1964).
4. BURT, V. K., GREEN, W. J.: Studies of calcium-sensitive ATP-ase in chicken heart ventricle cells. *Exp. Cell. Res.* **65**, 170 (1971).
5. BUTTERWORTH, J.: Histochemistry of non specific phosphatases: the use of p-nitrophenyl-phosphate and s-glycerophosphate. *Histochem. J.* **6**, 477 (1971).
6. CSILLIK, B., DAVIS, R.: Electron microscopic localization of the „lead-reactive substance” in the myoneural junction. *Acta Biol. Hung.* **15**, p. 203 (1964).
7. DALTON, A. J., ZEIGLER, R. F.: A simplified method of staining thin sections of biological material with lead hydroxide for electron microscopy. *J. biophys. biochem. Cytol.* **7**, 409 (1960).
8. DEIMLING, O.: Die Darstellung phosphatfreisetzender Enzyme mittels Schwermetall-Simultan-Methoden. *Histochemie* **4**, 48 (1964).
9. ERNST, S.: Cytochemical localization of anabain-sensitive potassium dependent 9phosphate activity in the secretory epithelium of the avian salt gland. *J. Histochem. Cytochem.* **20**, 23 (1972).
10. GANOTE, C. E., ROSENTHAL, A. S., MOSES, H. L., TICE, L. W.: Lead and phosphate as sources of artifact in nucleoside phosphatase histochemistry. *J. Histochem. Cytochem.* **17**, 641 (1969).
11. GILLIS, J., PAGE, S. G.: Localization of ATP-ase activity in striated muscle and probable sources of artifact. *J. Cell Sci.* **2**, 113 (1967).
12. GLICK, D.: Histochemical localization of adenosintriphosphatase. *Science* **103**, 599 (1946).
13. GLICK, D., FISCHER, E. E.: The histochemical localization of adenosine triphosphatase in plant and animal tissues. *Science* **102**, 429 (1945).
14. GÖMÖRI, G.: Microtechnical demonstration of phosphatase in tissue sections. *Proc. Soc. Exp. Biol.* **42**, 23 (1939).
15. GUTH, L.: Histochemical demonstration of (Na+ — K+) activated ATP-ase. *J. Histochem. Cytochem.* **22**, 320 (1974).
16. HAJÓS, F., SÓTONYI, P., KERPEL-FRONIUS, S., SOMOGYI, E., BUJDOSÓ, Györgyi: The ultrastructural demonstration of mitochondrial ATP-ase activity by the ATP-dependent accumulation of Ca⁺⁺. *Histochemistry* **40**, 89 (1974).
17. HEBER, U.: Freezing injury in relation to loss of enzyme activities and protection against freezing. *Cryobiology* **5**, 188 (1968).
18. HORI, H.: On the validity of the Wachstein-Meisel method for adenosine triphosphatase. *Acta Histochem. Cytochem.* **3**, 136 (1968).
19. JACOBSEN, H. O., JÖRGENSEN, P. L.: A quantitative biochemical study of the lead method for localization of adenosine triphosphate-hydrolyzing enzymes. *J. Histochem. Cytochem.* **17**, 443 (1969).
20. KHAN, M. A., PAPADIMITROU, J. M., HOLT, P. G., KAKULAS, B. A.: A calcium-citro-phosphate technique for the histochemical localization of myosin ATP-ase. *Stain Technology* **47**, 277 (1972).
21. KHON, M. A., PAPADIMITROU, J. M., HOLT, P. G., KAKULAS, B. A.: A modified histochemical technique for sarcoplasmic reticular ATP-ase. *Histochemie* **30**, 329 (1972).
22. KARNOVSKY, M. J.: Simple methods for staining with lead at high pH electron microscopy. *J. biochem. biophys. Cytol.* »», 729 (1961).
23. KERPEL-FRONIUS, S., HAJÓS, F.: The use ferricyanide for light and electron microscopic demonstration of succinic dehydrogenase activity. *Histochemia* **14**, 343 (1968).
24. KERPEL-FRONIUS, S., HAJÓS, F.: Electron microscopic demonstration of energy production and coupled respiratory of in situ mitochondria. *J. Histochem. Cytochem.* **81**, 740 (1970).
25. LUPPA, H., RODON, M., MARTIN, D.: Histochemische Darstellung unspezifischer alkalischer und unspezifischer saures Phosphatase mit p-Nitrophenylphosphat als Substrat. *Acta Histochem.* **37**, 197 (1970).
26. MILLONIG, G.: A modified procedure for lead staining of thin sections. *J. biophys. biochem. Cytol.* **11**, 736 (1961).
27. MOSES, H. L., ROSENTHAL, A. S.: Pitfalls in the use of lead ion for histochemical localization of nucleoside phosphatases. *J. Histochem. Cytochem.* **16**, 530 (1968).

28. MOSES, H. L., ROSENTHAL, A. S.: On the significance of lead catalyzed hydrolysis of nucleoside phosphates in histochemical systems. *J. Histochem. Cytochem.* **15**, 354 (1967).
29. MOSES, H. L., ROSENTHAL, A. S., BEAVER, D. L., SCHUFFMAN, S. S.: Lead ion and phosphatase histochemistry. II. Effect of adenosine triphosphate hydrolysis by lead ion on the histochemical localization of adenosine triphosphatase activity. *J. Histochem. Cytochem.* **14**, 702 (1966).
30. MUSTAFA, M. G., CROSS, C. E., MUNN, R. J., HARDIE, J. A.: Effects of divalent metal ions on alveolar macrophag membrane ATP-ase activity. *J. Lab. and Clin. Med.* **77**, 563 (1971).
31. NAIDO, D., PRATT, O. E.: The localization of some acid phosphatases in brain tissue. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.* **14**, 287 (1951).
32. NAIDOO, D., PRATT, O. E.: Localization of aneurin pyrophosphatase in brain. *J. Neurol. Psychiat.* **15**, 164 (1952).
33. NOVIKOFF, A. B.: Enzyme localization with Gomori type lead phosphate procedures: real or artefact. *J. Histochem. Cytochem.* **5**, 366 (1970).
34. NOVIKOFF, A. B.: Enzyme localizations with Wachstein—Meisel procedures. *J. Histochem. Cytochem.* **6**, 353 (1967).
35. ODA, T. J.: Cytochemical electron microscopic demonstration of adenosine triphosphatase in unfixed mitochondria. *J. Electron Microscopy* **14**, 343 (1965).
36. OSTROWSKI, K., BARNARD, E. A., STOCKA, Z., DANZYKIEWICZ, Z.: Autoradiographic methods in enzyme cytochemistry. *Exp. Cell Res.* **31**, 89 (1963).
37. OSTROWSKI, K.: The labelled inhibitor method in cytoenzymology. *Histochem. J.* **4**, 467 (1972).
38. PADYKULA, M. A., HERMAN, E.: The specificity of the histochemical method for adenosine triphosphatase. *J. Histochem. Cytochem.* **3**, 170 (1955).
39. PRATT, O. E.: The proportion of phosphatase activity demonstrable in brain by histological techniques. *Biochem. J.* **55**, 171 (1953).
40. REYNOLDS, E. S.: The use of lead citrate at high pH as electronopaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* **17**, 208 (1963).
41. ROSENTHAL, A. S., MOSES, H. L., TICE, L., GANOTE, C. E.: Lead ion and phosphatase histochemistry III. The effects of lead and adenosine triphosphate concentration on the incorporation of phosphate fixed tissue. *J. Histochem. Cytochem.* **17**, 608 (1969).
42. ROSENTHAL, A. S., MOSES, H. L., BEAVER, D. L., SCHUFFMAN, S. S.: Lead ion and phosphatase histochemistry. I. Nonenzymatic hydrolysis of nucleoside phosphatase by lead ion. *J. Histochem. Cytochem.* **14**, 698 (1966).
43. ROSTGARD, J., BARNETT, R. J.: Fine structural observations of the absorption of lipid particles in the small intestine of the rat. *Anat. Rec.* **152**, 325 (1965).
44. SCHULZE, W., WOLLENBERGER, A.: Einfluss von Glutar- und Hydroxydipinaldehyd auf die Adenosintri-phosphatase-Aktivität verschiedener subzellulären Fraktionen des Herz- und Skelettmuskels. *Acta biol. med. germ.* **14**, 601 (1965).
45. SCHULZE, W., WOLLENBERGER, A.: Zytochemische Lokalisation und Charakterisierung von phosphatabspaltenden Fermenten im sarkotubulären System quergestreifter Muskeln. *Histochemie* **10**, 140 (1967).
46. SOMOGYI, J.: Az aktív iontranszport enzimátikus mechanizmusa. *MTA Biol. Oszt. Közl.* **11**, 239 (1968).
47. SOMOGYI, E., SÓTONYI, P., BUJDOSÓ, Györgyi: Electron-microscopic histochemical examination of potassium-sodium-dependent myocardial ATP-ase activity. *Acta Histochem.* **40**, 64 (1971).
48. SOMOGYI, E., SÓTONYI, P., BUJDOSÓ, Györgyi: Enzymatic-histochemical examination of magnesium-dependent myocardial ATP-ase activity under the electron microscope. *Acta Histochem.* **39**, 286 (1971).
49. SOMOGYI, E., SÓTONYI, P., BUJDOSÓ, Györgyi: Electron-microscopic histochemical study of myosin ATP-ase activity. *Histochemie* **29**, 172 (1972).
50. SOMOGYI, E., SÓTONYI, P., BUJDOSÓ, Györgyi: Electron-microscopic histochemical demonstration of sarcotubular ATP-ase in the myocardium. *Acta Histochem.* **43**, 302 (1972).
51. SÓTONYI, P., SOMOGYI, E., DÁVID, H., MARX, I.: Autoradiographic and electron microscopic studies with ³H-ATP on the function of mitochondria. *Histochemie* **32**, 67 (1972).
52. SÓTONYI, P., KERÉNYI, N. A., SOMOGYI, E.: The problems of assessment of ATP-ases in light and electron microscopy. *Acta Morphologica Acad. Sci. Hung. Suppl. Ó»N*, 49 (1973).
53. SÓTONYI, P., SOMOGYI, E., KERÉNYI, N. A.: Use of neodymium nitrate in electron microscopic histochemical demonstration of ATP-ase. *Histochemistry: közlés alatt.*

54. STADTHOUDERS, A. M.: The chemical mechanism of the glycogen-lead interaction. *J. Histochem. Cytochem.* **14**, 741 (1966).
55. SZINAY, GY., SÓTONYI, P.: Morphological changes due to anticoagulants of rare earth metal type. *7s Congr. Int. Acad. of Legal Medicine. Abstract.* 297 (1964).
56. TAKAMATSU, H.: Histologische und biochemische Studien über die Phosphatase: histochemische Untersuchungsmethodik der Phosphatase und deren Verteilungen Organen und Geweben. *Trans. jap. path. Soc.* **29**, 492 (1939).
57. TICE, L. W.: Studies on lead inhibition of adenosine triphosphatases. III. *Int. Kongr. Histo- und Cytochem. New York 1968. Springer Inc., New York* 270 (1968).
58. TICE, L. W.: Lead-adenosine triphosphate complexes in adenosine triphosphatase histochemistry. *J. Histochem. Cytochem.* **17**, 85 (1969).
59. TICE, L. W.: A comparison of the distribution of enzymatically and non-enzymatically produced lead phosphate in insect flight muscle. *Tissue and Cell* **1**, 97 (1969).
60. WACHSTEIN, M., MEISEL, E.: Histochemistry of hepatic phosphatase at a physiologic pH. *Amer. J. clin. Pathol.* **27**, 13 (1957).
61. WACHSTEIN, M., MEISEL, E.: The histochemical demonstration of secretory capillaries in the pancreas with the aid of substrate specific phosphatases. *J. biophys. biochem. Cytol.* **6**, 119 (1959).
62. WATSON, M. L.: Staining of tissue section for electron microscopy with heavy metals. II. Application of solutions containing lead and barium. *J. biophys. biochem. Cytol.* **4**, 727 (1958).
63. ZIMMY, M. L., ROMENO, C. C., HAYDEL, R.: ATP-ase and SDH of hypothermic ground squirrels and rats. *Cryobiology* **9**, 61 (1972).
64. ZIMMY, M. L.: Histochemistry of heart ATP-ase, cit.: Jannigen (1973). *Bull. Dalhousie. Univ.* **19**, 233 (1974).