

HYPOXIÁS METABOLITOK BIOLÓGIAI HATÁSAI ÉS EGYES TULAJDONSÁGAINAK JELLEMZÉSE*

BODA DOMOKOS, az orvostudományok doktora

Közlésre érkezett: 1974. II. 27.

Jelen munka legfőbb alapgondolata, hogy a szervezet életfolyamatait döntően meghatározó eddig ismert homeostatikus tényezőknél (isosmia, isohydria, isovolaemia és isoionia) kívül még egy további, ezekhez hasonló jellegű és jelentőségű egyensúly-rendszer: a homeostatikus redox-egyensúly (HRE) rendszer létezik. A redox-egyensúly elnevezés arra utal, hogy a rendszert pro- és antioxydánsok egyensúlya alkotja. A homeostatikus jelző pedig arra hivatott, hogy általa ezt a rendszert megkülönböztessük a viszonylag jól ismert intracelluláris redox rendszerektől. Itt milieuserű, ezáltal sokkal általánosabb hatásról van szó, amely ugyanakkor háttér jelleggel a specifikus intracelluláris redox folyamatokat, a sejt egész működését meghatározza, szabályozza és módosítja. Ez tehát egyike a biológiai életfolyamatokat szabályozó mechanizmusoknak.

A fent vázolt funkciójú HRE-rendszer létezése mellett nagyon sok megfigyelés szól, de az még nem tekinthető bizonyítottnak. Ugyanakkor minél pontosabb körülhatárolása igen sokat ígér az életjelenségek jobb megértésében, a kóros egyensúlyi állapotok célzott helyreállítása pedig új irányt hozhat a pathophysiologiai alapon nyugvó terapiában.

A HRE-rendszer tanulmányozása azonban nagy nehézségekkel jár. Az alapok sem tisztázottak. Az egyensúlyt meghatározó komponensek csak kis részben ismertek. A hatások eredőjének mérése fizikokémiai, potenciometriai alapon nem lehetséges, az erre a célra ajánlott módszerek megbízhatatlanok. A hatás *in vivo* áttételek útján, messzemenően módosulhat, potenciálódhat vagy inaktiválódhat.

A HRE-rendszer témakörének van irodalmi előzménye (Bernheim, 1963, Chance 1962, Eldjarn 1965, Haugard 1968, Rabotnowa 1963, Robin és Theodore 1973, Shapiro 1972, Shapiro és mtsai 1973), köztük jelentékeny helyet foglalnak el magyar szerzők beszámolóí (Csapó és mtsai 1966, Kovách és Sándor 1973, Pálos 1964, Puppí és mtsai (1972)). Közvetlenül erre irányuló adat azonban

* Megvitatásra került a Biológiai Aktív Vegyületek Kutatása kutatási főirány Bizottsága témakollégiumán, 1973. nov. 15-én Budapesten.

kevés található, inkább rejtve van a más címszavak irodalmi anyagában. Indirekt módon erre csupán utaló adat viszont beláthatatlanul sok van.

A kérdésre vonatkozó saját korábbi vizsgálataimról több közleményben számoltam be (*Boda* 1957a, 1957b, *Boda* és *Kiss* 1955, 1957, *Boda* és *mtsai* 1967, 1969, 1971a, 1971b, 1971c, *Ferencz* és *Boda* 1950, *Virág* és *Boda* 1971). Az utóbbi években a kérdést több irányból megközelítve újabb kiterjedt vizsgálatokat végeztünk. Ezek egy-egy különálló csoportot képeznek, de jelentőségük valójában véve összefüggésükben van. Jelen közlemény ezeket az újabb adatokat foglalja össze.

Régebbi vizsgálatainkkal és az egyéb irodalmi adatokkal együtt ezek az eredmények már lehetővé teszik, hogy a HRE-rendszer határait megközelítően körvonalazzuk, egyben a vizsgálatok ez újabb szakaszát lezárjuk, majd kijelöljük a következő tennivalókat.

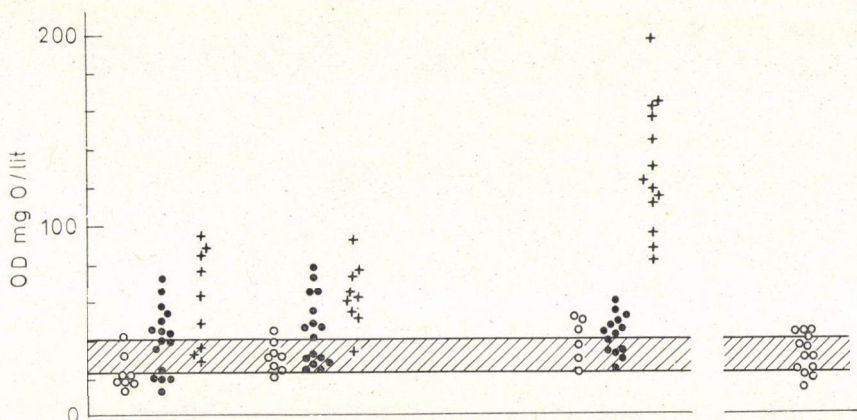
Megfigyelések a szervezet homeostatikus redox-egyensúlyára és annak eltolódásaira vonatkozóan

Alapmegfigyelésként hyperacut csecsemőkori kórképekben a liquor cerebrospinalisban oxidáló szerekkel (permanganát, ceriumszulfát) hidegen is reagáló (*Ferencz* és *Boda* 1950, *Boda* 1957) erősen fokozott redukciós tulajdonságot ismertünk fel. A hatásban fehérjék szerepe kizárható. A jelenség a heveny anyagcserezavar súlyosságával párhuzamos. A reakció tetrazolium-kékkel is létrejön, de a lúgos közegben lassan a cukrok is reagálnak és a redox festékkel való reakciót zavarják.

Haladást hozott az a lehetőség, hogy a hatást fehérje-mentesített vérsavóban mutattuk ki, a reakciót ceriumszulfát fogyásából quantitative mérni tudtuk (*Boda* 1957). Technikailag a meghatározás egyszerű jodometriás titrálással lehetséges. Ezt az eljárást mikrosítottuk is, de fotometriás eljárást is kidolgoztunk. Ezekkel a módszerekkel a vérsavóban mért redukciós túlsúlynak a dinamizmusát az egyes kórképekben sorozatos vizsgálatokkal követni tudtuk. A jelenség illusztrálására újszülöttek-koraszülöttek hypoxiás állapotaiban (extrauterin élethez való adaptációs zavaraiiban) kapott eredményeket mutatjuk be. (1. sz. ábra).

Ezen lehetőségek birtokában aztán mód nyílt a jelenség kísérletes úton való előidézésére, így keletkezési körülményeinek tanulmányozására is. Úgy találtuk, hogy a fehérjementes szérumban, akár kémiai fehérjementesítés, akár ultrafiltrálás után, a fokozott redukció klinikai viszonyok között minden heveny kórképben kimutatható, kísérletesen pedig pl., traumás shock előidézésével és hypoxiával váltható ki. A keletkezés körülményeinek és anyagi természetének további kiderítésében lényeges az a megfigyelés, hogy a hatás sterilen állott vérben, tehát *in vitro* is létrejön, a fokozott reduktivitást döntően a vörösvérsejtek termelik. A spektrofotometriás és a biológiai aktivitásra vonatkozó adatok szerint ez azonban nem teljesen azonos az *in vivo*, az egész szervezeten belül keletkezett hatással.

Az ilyen módon jól jellemezhetően kóros tulajdonságot mutató szérumokban kísérleteztünk a redoxpotenciál mérésével, azonban reprodukálhatatlan és megbízhatatlan eredményeket kaptunk. Behatóan foglalkoztunk a Ziegler-féle (Ziegler 1960) módszer alkalmazásának elbírálásával is, amely a platinaelektrod oxigen szennyezettségét negatív pólusú előfeszítés létrehozásával igyekszik kiküszöbölni, de ez sem vezetett eredményre.



I. ábra. Kóros tünetektől mentes (○), hypoxiás tüneteket mutató, de gyógyult (●) és halálos kimenetelű (+) koraszülött esetek szérum redukzív aktivitása (oxygen deficit (O. D.) értéke) az élet 1., 2., 4. (exitus esetén az elhalálozás napján) és a 12. napján

A homeostatikus redox-egyensúlyzavar biológiai következményei és a kóros szérumok biológiai aktivitása

Következő feladatunk volt annak vizsgálata, hogy a kóros viszonyok között, továbbá kísérletesen előidézett vérsavó eltérése a vérsavó, vagy ultrafiltrátuma fokozott redukzív aktivitása biológiai következményekkel jár-e. Ennek vizsgálatára olyan kísérleti rendszereket igyekeztünk megválasztani, amelyekről ismert, ill. kellő alapja van annak a feltételezésnek, hogy az oxidációs-redukciós egyensúly-hatásokra érzékenyek. Célunk volt az is, hogy a hatásért felelős tényező vizsgálatához biológiai teszt céljára is alkalmas modelleket dolgozzunk ki.

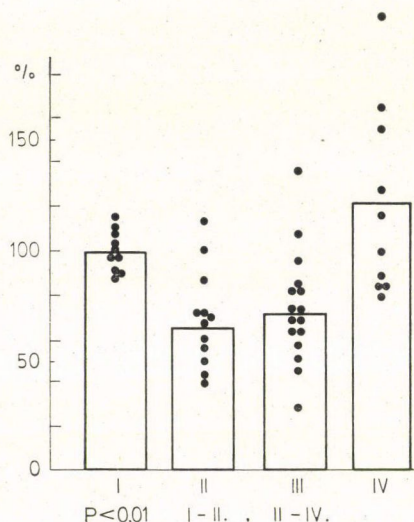
Az alábbiakban ismertetjük a hypoxiás vérsavó biológiai aktivitására vonatkozó vizsgálati eredményeket.

a) *Glucose felvétel gátlása kóros szérumokból*

Ezt a hatást patkány diaphragma-tesztel legelőször toxicosis csecsemők vérsavójával és liquorával észleltük (Boda 1957, Boda és Kiss 1957). Azóta az ilyen szerű hatást elég intenzíven vizsgálták az uraemiás faktor köze-

lebbi analysisére és fordítottját is kimutatták, hogy a különböző szérumok dialysisével az inzulin aktivitás fokozódik.

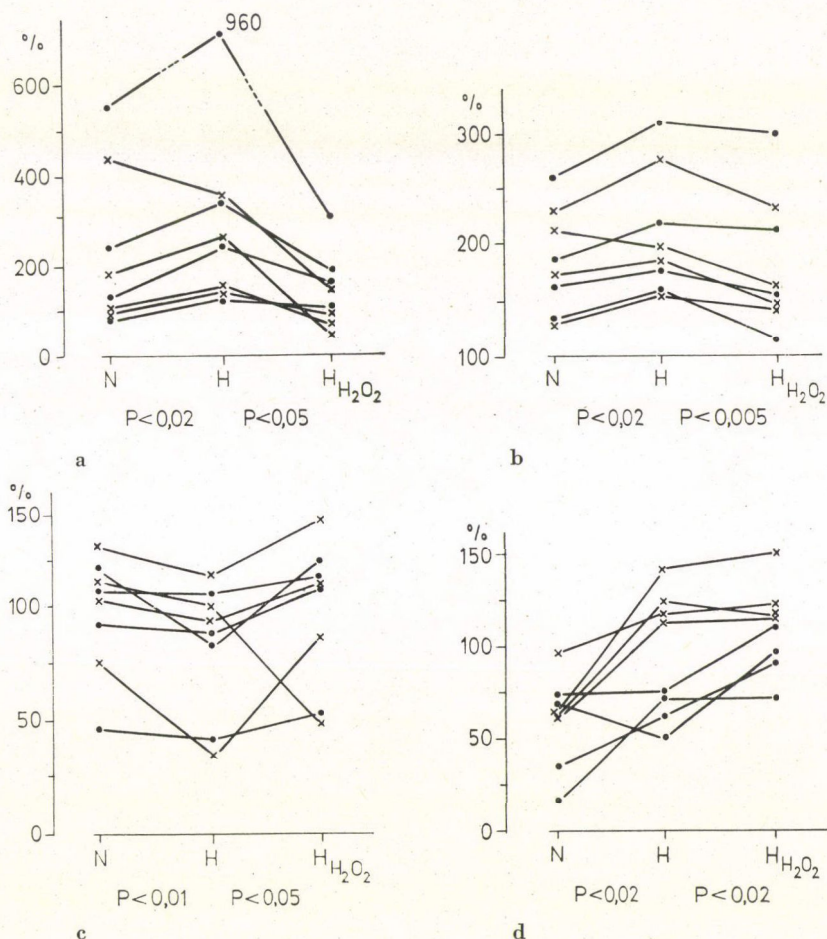
Shockos nyulak szérumával folytatott vizsgálatainkban kimutattuk, hogy ha az olyan szérumhoz, amelyben a cukorfelvétel gátolt volt, inzulint adunk, ez a gátlást alig befolyásolja, de egyidejű oxydans hatására a cukorfelvétel normalizálható (2. sz. ábra, Boda 1957).



2. ábra. Izomszeletek glucose felvétele shockos, 1 E/ml inzulint tartalmazó shockos, továbbá inzulint és Na-permanganátot tartalmazó szérumból, a normál szérumból való glucose felvételhez viszonyítva. Jelölések: I. normál szérum, II.: shockos szérum, III.: shockos szérum + inzulin, IV. shockos szérum + inzulin + Na-permanganát

b) Egyes enzimek aktivitásának változása normális és kóros szérum ultrafiltrátumot tartalmazó közegben

Az enzimekre való hatás tanulmányozásában azt vizsgáltuk, hogy egyes enzimek aktivitása hogyan változik normális és hypoxiás szérum-ultrafiltrátumokban. Az ultrafiltrációt AMICON diaflo rendszerben UM—2 membránnal végeztük, amely 5000 mol súly alatti anyagokat enged át. Az így kezelt vérsavó redukciós aktivitása a kémiai fehérjementesítéssel végzett vizsgálatokkal azonos maradt. A vizsgálatokat 4 enzyimmel: jódozással részlegesen inaktivált tejsavdehydrogenázzal, coeruloplasminnal, acetylcholin-esteraseval és ribonucleaseval végeztük. A kísérletek során a normális és hypoxiás újszülöttek, valamint hypoxiás kísérleti állatok vérsavó-ultrafiltrátumának enzimek aktivitását módosító hatását a különböző pufferekben kapott aktivitáshoz viszonyítottuk. Valamennyi vizsgált enzim esetében a szérum ultrafiltrátumok módosítást váltottak ki (3a—d. ábra). Különböző irányú változást többnyire a normális szérum-ultrafiltrátum is okozott.



3. ábra. a) Jódózott LDH aktivitás változás normál (N), hypoxiás (H) és H₂O₂-vel kezelt hypoxiás (H_{H₂O₂}) szérum ultrafiltrátumokban, sós pufferes kontrollhoz viszonyítva. b) Coeruloplasmín aktivitás változások. Jelzések a 3/a. ábra szerint. c) Ribonuclease aktivitás változások. Jelzések a 3/a. ábra szerint. d) Acetylcholinesterase aktivitás változás. Jelzések a 3/a. ábra szerint

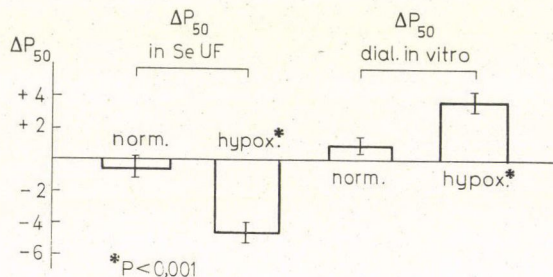
A kóros szérumok ultrafiltrátuma enzim-aktivitást módosító hatásának a HRE-rendszerrel való kapcsolatát H₂O₂-vel való előkezeléssel bíráltuk el. Az eredményeket grafikonokon (3a—d ábra) mutatjuk be.

c) Vörösvérsejtek O₂-affinitásának változásai szérum-ultrafiltrátumokban

A vér O₂-transzport funkciója, a haemoglobin O₂-kötése egyike a leg-alapvetőbb életjelenségeknek. Az erre vonatkozó törvényszerűségek vizsgálata jelenleg az érdeklődés előterében áll. Ezekből eddig kiderült, hogy a haemoglobin O₂-affinitását a pH-n, a hőmérsékleten kívül számos tényező, mint elektrolitok, a haemoglobin, továbbá a vörösvérsejtek anyagcsere álla-

potá befolyásolja. Újabban főleg a 2,3-diphosphoglycerát kulcsfontosságú szerepe derült ki a vörösvérsejtek O_2 kötése szabályozásában. Figyelemre méltóak azok az adatok, amelyek szerint számos gyógyszer is megváltoztatja a vér P_{50} (a vér pO_2 értéke 50%-os O_2 -saturatio esetén 7,40 pH és $37^\circ C$ mellett) értékét. A kérdés intenzívebb tanulmányozásához nyitott utat számunkra a P_{50} meghatározásának általunk kidolgozott új módszere (Boda 1973).

Saját legújabb vizsgálatainkat bemutató 4. sz. ábra szerint a hypoxiás szérum ultrafiltrátum jelentősen csökkentette a normál vér P_{50} értékét, míg



4. ábra. Normális vörösvértettek P_{50} változása (ΔP_{50}), normális és hypoxiás szérumok ultrafiltrátumában. Normális és hypoxiás koraszülöttek vér P_{50} értékének változása (ΔP_{50}) *in vitro* dialysis hatására

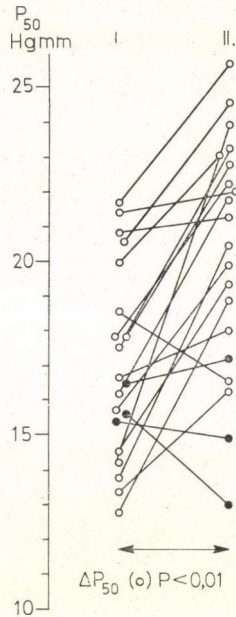
a normál szérum ultrafiltrátumának ilyen hatása nem volt. Hogy itt valóban humorális hatással állunk szemben, azt az előbbi kísérlet fordítottja is igazolta. Úgy találtuk, hogy a hypoxiás esetekből származó vért *in vitro* dialysalva a vér P_{50} értéke emelkedett. Normál vér *in vitro* dialysise ilyen hatással nem járt (4. sz. ábra). A további vizsgálatokban *in vivo* is igazolni tudtuk, hogy az extrem fokban csökkent vér P_{50} létrejöttében humorális pathológiás homeostatikus tényezőknek van szerepük. RDS-ás koraszülöttekben peritoneális dialysis kezelés után a P_{50} érték szabályszerű emelkedését figyeltük meg (Boda és mtsai 1969, 1971, 5. sz. ábra).

d) *Hypoxiás szérumok ultrafiltrátumainak hatása véralvadási rendszerekre és a hatásnak a HRE zavarral való kapcsolata.*

Pálos (1964) évekkkel ezelőtti vizsgálat-sorozatának eredményei alapján már eljutott ahhoz a végkonklúzióhoz, hogy a véralvadás szervezeten belüli egyensúlyát, a vérzékenység és thrombosis végletek közötti egyensúlyi állapotot a szervezet redox egyensúlya tartja fent. Ilyen alapon joggal vártuk, majd igazoltuk is, hogy a kóros HRE-t tükröző hypoxiás szérum ultrafiltrátumok érzékeny módon befolyásolják *in vitro* is az egyes alvadási rendszereket.

Saját idevonatkozó vizsgálataink (Virág és Boda 1971) szerint hypoxiás újszülöttek vérsavó ultrafiltrátuma, továbbá kísérleti hypoxiás állatok savójának ultrafiltrátuma a kontrollhoz képest lényegesen megnyújtotta a test-

plasmaként használt normál plasma prothrombin idejét, a thromboplastin activatiós időt, az izolált prothrombin időt és a thrombin titrálásakor mért időket. A kóros ultrafiltrátumok H_2O_2 előkezelése (amit követően természetesen a peroxyd-felesleget enzimatikusan elbontottuk) az észlelt hatást csaknem teljesen közömbösítette.



5. ábra. Peritonealis dialysissel kezelt hypoxiás koraszülöttek vér P_{50} értékének változása a kezelés során. Terminális stádiumban elkezdett dialysisek (●), egyéb dialysált esetek (○)

Ebben a kísérletben is elvégeztük a fordított előjelű vizsgálatot, amikor respirációs distress syndromás koraszülöttek erősen megnyúlt partialis thromboplastin aktivítási idejű savójában *in vitro* dialysis hatására az aktivitást lényegesen mérsékelni lehetett.

e) *Az anoxiás anyagcseretermékek biológiai aktivitásának ex juvantibus peritonealis dialysis kezeléssel való igazolása.*

Mielőtt még tovább jutottunk volna a hypoxiás HRE-zavar anyagi természetének tisztázásában, a vizsgálatok már pár évvel ezelőtti stádiumában kínálkozott lehetőség arra, hogy *in vivo* kísérletekben „ex juvantibus” hatás alapján megbizonyosodjunk afelől, hogy anaerob anyagcsere túlsúlya esetén a testnedvekben kimutatható metabolit akkumuláció nemcsak passzív tünet, hanem az — mint újabb kóros homeostatikus tényező — lényeges biológiai hatást is fejt ki.

Először újszülött és felnőtt kísérleti állatokon megfelelő kontrollokkal való összehasonlítással végzett vizsgálatok eredményei azt mutatták, hogy peritonealis dialysissal a kísérleti állatok hypoxiával szembeni túlélése jelentősen fokozható (Boda, Murányi, Bélay és Eck 1969).

A kedvező állatkísérleti eredmények tapasztalatai alapján került sor a peritonealis dialysis terápiára újszülöttkori respirációs distress syndroma kezelésében (Boda, Murányi, Altörjay, Veress 1971). A legsúlyosabb csoport randomizált kontrollal összehasonlítva kapott kezelési eredményei az eljárás hatásosságát meggyőzően igazolták.

f) *Antioxydans hatás vizsgálatok vörösvérsejtek oxydatív haemolysise gátlásával.*

Az élő szervezet sejtjei oxidatióra rendkívül hajlamos rendszerek halmaza. Az élet fennmaradásának fundamentális feltétele az elemi oxygen aggressziójával, az oxydatiós stresszel szembeni védekezés. Ilyen szempontból ismét az egyik legjobban tanulmányozott sejt-típus a vörösvérsejt.

Az autooxydatio elleni védelmet a leghatásosabban a vörösvérsejt glutathion tartalma és ennek fenttartását szolgáló metabolikus folyamat, különösen a pentose-anyagsere út biztosítja. Enzymatikus szempontból ebben a védelemben központi szerepe van a glutathion-peroxydasnak és -reductasnak.

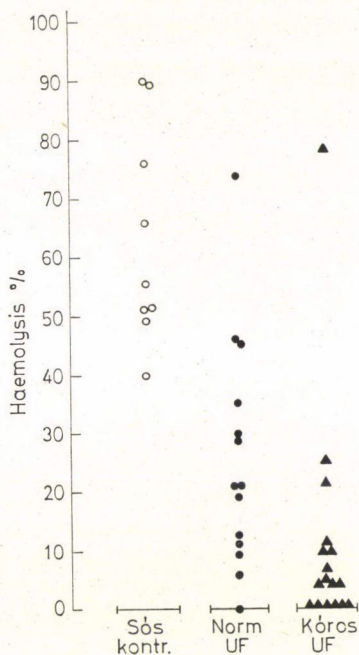
A vörösvérsejt membránja stabilitásának fenttartásában különleges szerepe van az E-vitaminnak, aminek alacsony vérszintje egyértelmű a vérsejt oxydánsokkal szembeni ellenállásának csökkenésével. Gerlóczy (1972) vizsgálatai szerint az E-vitamin a feltétele a normális extrauterin életnek is, ugyanakkor jelenléte a foetalis életben káros.

A fentiekén kívül a kérdéssel foglalkozó kiterjedt irodalom elolvasásakor, a közvetlen mérési eredmények mérlegelése alkalmával számos utalást kaptunk arra, hogy a vörösvérsejtek autooxydatióval szembeni védelmében is lényeges tényező a környezet antioxydans potenciálja, a korábban vázolt HRE-rendszer. Ilyen értelemben látszott indokoltnak megvizsgálni, hogy a vérsavó ultrafiltratuma kifejti-e protektív hatást a vörösvérsejt oxydatív haemolysisével szemben, továbbá, hogy van-e különbség a normál és anoxiás szérum ultrafiltratuma hatása között.

A vörösvérsejt oxydans hatással szembeni resistenciája vizsgálatára a legelterjedtebb a peroxyd haemolysis test. A H_2O_2 hatás helyett specifikusabb a lipid peroxydatio mérése, amikor thiobarbiturát hozzáadás után a képződött malonylaldehyd mennyiségét határozzuk meg fotometriásan. Saját vizsgálatainkban mindkét eljárást alkalmaztuk, de az egységes értékelés érdekében csak a peroxyd haemolysis testtel kapott eredményeket ismertetjük.

A 6. sz ábrán György és Rose módszere, Bertran és Nathan módosítása szerint végzett klasszikus haemolysis testtel kapott eredményeket mutatjuk be. A 0,2 ml mosott köldökszinór, ill. koraszülött vért tartalmazó puffer 2,5 ml-es rendszerében 1,2 ml isotoniás sóoldatot, ill. normális és hypoxiás

újszülöttektől származó szérum ultrafiltrátumot vittünk be, majd 2,5 ml 2%-os H_2O_2 hozzáadása után 3 h múlva a haemolysis %-át fotometriásan határoztuk meg. A 6. ábra adatai szerint a sós kontrollokkal szemben a normális szérum ultrafiltrátuma is kifejezett védőhatást fejtett ki, azonban a hypoxiás szérum ultrafiltrátumok antioxydans hatása ezt jelentősen meghaladta (6. sz. ábra).



6. ábra. Újszülöttek, koraszülöttek vörösvérsejtjeinek haemolysise peroxyd haemolysis testben. Peroxyd haemolysis pufferolt isotóniás sóban (○), vörösvérsejt haemolysis norm. szérum ultrafiltrátumot tartalmazó pufferolt sóban (●), és hypoxiás szérum ultrafiltrátumot tartalmazó pufferolt sóban (▲)

g) Tájékoztató jellegű pharmacologiai vizsgálatok túlélő szervkészítményeken

A most ismertető vizsgálatokból érdemi konklúziót csak annyit lehet levonni, hogy a vérsavó fehérjementes ultrafiltrátuma is, ilyen rendszerben is aktivitást fejt ki. A kapott eredmények egyébként tájékoztató jellegűek.

Urethannal gyengített (10% urethan 0.1 ml) békaszíven tett megfigyeléseket a következő táblázat összegezi:

Szérum ultrafiltrátumok hatása uretannal gyengített békaszíven

Vizsgálati anyag	Megfigyelések száma	Nincs, ill. igen gyenge hatás	Határozott, ill. igen erős amplitúdó növ.
Norm. human UF	1	1	0
Norm. tengeri m. UF	3	3	0
Hypoxiás human UF	11	2	9
Hypoxiás teng. m. UF	7	5	2
Hypox. hum. peroxyddal kezelt UF	2	0	2
Hypoxiás teng. m. peroxyd kezelt UF	3	3	0

Látjuk, hogy urethannal gyengített békaszíven kifejezett ill. igen erős amplitúdó növekedést csak hypoxiás szérum ultrafiltrátumokkal kaptunk. Azonban nem világos, miért kevésbé hatásos ilyen szempontból a kísérleti állat anyaga és hogy miért viselkedik eltérően a human és a kísérleti állat peroxyddal előkezelt fehérjementes széruma.

További, tájékozódó jellegű vizsgálatokban azt találtuk, hogy

1. tengerimalac colon preparátumokon a különböző ultrafiltrátumoknak adrenalin hatást prolongáló effektusa nem volt.

2. patkány uteruson 5 közül egyetlen ultrafiltrátum váltott ki görcsöt, amit atropin nem befolyásolt.

3. Deseril (50 gamma) normál szíven amplitúdó csökkenést okozott, amit 3 vizsgálatban kóros szérum ultrafiltrátumok részben restitúáltak.

3. Hypoxiás vérsavó ultrafiltrátumok tulajdonságainak jellemzése

Spektrofotometriás vizsgálatok: a permanganáttal és ceriumszulfáttal szembeni reaktivitás alapjelenségének ismeretében vizsgáltuk a szérum UF-ok ezen anyagokkal szembeni reakció-kinetikáját és ultraibolya spektrumát. Az emberi és kísérleti állatok anyagainak vizsgálati leletei között lényegi különbség nem adódott, a normális és hypoxiás szérum UF-ok között viszont igen jelentékeny eltérést észleltünk. A vizsgálatokat Specord UV-VIS regisztráló fotometerrel végeztük.

A ceriumszulfáttal szembeni reakciót $n/1000$ conc-jú reagenst és 1 : 50 hígítású UF-ot tartalmazó rendszerben, szobahőn a $320 \mu\text{m}$ hullámhosszon észlelt extinctio csökkenésével mértük. Permanganát esetében $n/500$ reagenst és 1 : 25 hígítású UF-ot használtunk, az extinctió csökkenés ütemét $555 \mu\text{m}$ hullámhosszon néztük.

A vizsgált oxydánsokkal (ceriumszulfáttal és K-permanganáttal) való reakció sebességet az oxydánsra jellemző hullámhosszon mért absorbtio-csökkenés folyamatos regisztrálásával mérve valamennyi rendszerben nagy pontossággal (0,984 és 0,997 közötti kor. koef.) exponentialis függvénynek megfelelő extinctio csökkenést mértünk. A függvény regressziós együtthatója (adott esetben $\ln \Delta \text{Ext}/\text{min}$) az egyes rendszerekben a következő:

Ceri, normál humán	:	— 0,009
Ceri, normál tengm.	:	— 0,022
Ceri, hypox. humán	:	— 0,068
Ceri, hypox. tengm.	:	— 0,083
Permang. norm. hum.	:	— 0,053
Permang. norm. tengm.:	— 0,085	
Permang. hypox hum.:	— 0,243	
Permang. hypox tengm.:	— 0,168	

A normális és hypoxiás szérum UF-ok egyszerű vizes hígításai ultraibolya-spektrumban jellemző eltérést mutattak. Az extinctiókat 210, 240,

265, 290 és 328 μm hullámhosszon összegezve, az 50-szeresen hígított szérum UF-ok vizsgálatával a következő értékeket kaptuk.

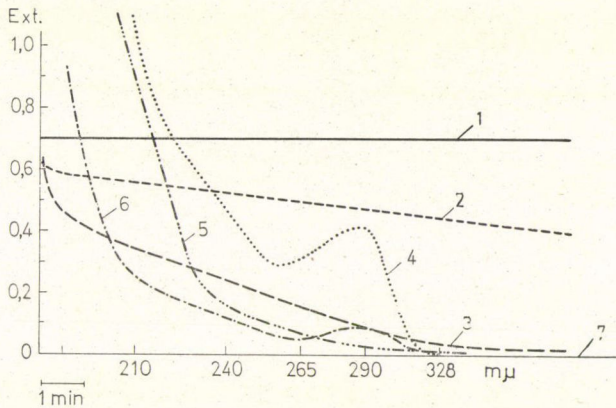
Normális és hypoxiás szérum ultrafiltrátumok extinciói az ultraibolya spektrum egyes hullámhosszain

Vizsgálati csoport	Vizsgálatok száma	Hullámhossz μm				
		210	240	265	290	328
Normális humán szérum	9	0,273 $\pm 0,151$	0,084 $\pm 0,025$	0,043 $\pm 0,008$	0,056 $\pm 0,022$	0,010 $\pm 0,006$
Hypoxiás humán szérum	10	0,712 $\pm 0,138$	0,198 $\pm 0,030$	0,122 $\pm 0,023$	0,159 $\pm 0,046$	0,019 $\pm 0,006$
Hypoxiás humán szérum KMnO_4 -el való reakció után	9	—	$\pm 0,134$ 0,044	$\pm 0,024$ 0,080	$\pm 0,018$ 0,038	—

Ezek szerint valamennyi mért hullámhosszon magasabb volt a hypoxiás szérumok UF-ának extinciója, ami a legkifejezettebb a 240–290 μm szakaszon volt.

A hypoxiás szérumoknak az UV spektrumban való absorbtíós többlete mind permanganáttal, mind H_2O_2 -vel való reagáltatás után lényegesen módosult.

A kapott eltéréseket egy normális és egy hypoxiás szérum UF esetében a 7. ábra szemlélteti.



7. ábra. Szérum ultrafiltrátumok spektrofotometriás analysise. 1. Cerium reagens extinciója 320 μm hullámhosszon. 2. 50-szeresen hígított normál szérum cerium szulfáttal való reakciójának időbeni lefutása. 3. 50-szeresen hígított hypoxiás szérum viselkedése hasonló körülmények között. 4. 50-szeresen hígított hypoxiás szérum ultrafiltrátum ultraibolya spektruma. 5. Ugyanezen szérum KMnO_4 -el való előkezelés után. 6. 50-szeresen hígított normál szérum ultrafiltrátum ultraibolya spektruma

Chromatographiás vizsgálatok

Vékonyrétegchromatographiát Macherey-Nagel-féle 300-as cellulózporból készült 0,25 mm-es rétegen vizsgáltuk. Futtató elegyként etanol: víz = 56 : 44 elegyét és 80 : 20 elegyét használtuk. Előhívásra a redukciós hatáson alapuló reakciókat alkalmaztuk.

Ezek a következők voltak:

1. $K_3Fe(CN)_6$ melegítés nélküli redukciója, a keletkező ferroionok detektálása $Fe_2(SO_4)_3$ -al. (Berlini-kék foltok megjelenése.)
2. A lemez $Ce_2(SO_4)_3$ -vel való lefűvése után újabb lefűvés o-dianizidinnel. A redukáló foltok színtelenek.
3. Lúgos tetrazólium-kék reakció. A reagáló foltok kékek.

Az 56 : 44 arányú etanol: víz futtatással az 1. előhívóval a hypoxiás szérum UF esetében Rf 0,5-nél igen intenzív és 0,65-nél kisebb folt jelenik meg. Ezek a foltok normális szérum esetén is láthatók, de lényegesen halványabban.

A 2. előhívóval három foltot kapunk 0,35, 0,5, 0,65 Rf értékekkel. Ugyancsak egyedül méretbeli különbséggel a normális és a hypoxiás kóros anyag között.

A 3. előhívó itt a hypoxiás szérum UF-mal 5, a normális szérum UF-mal 4 foltot ad, ugyancsak jelentős intenzitásbeli különbséggel.

Preparatív chromatographia. Többféle oszlopon végzett kísérlet alapján legjobban a Sephadex G 15-öt tartalmazó két egymás után kapcsolt oszlopon ($70 \times 4,5$ cm és $60 \times 2,5$ cm) történi szétválasztás vált be. Az oszlopokra 380–380 ml mennyiségű normál ill. hypoxiás nyúlsavó lyophylizált ultrafiltrátumát vittük fel 15 ml deszt. vízben oldva. Az eluálás deszt. vízzel történi 5 ml-es frakciókban, 84 ml/óra átfolyási sebességgel. Az aktív frakciók detektálása a frakció egy részéhez adott $Ce_2(SO_4)_3$ fogyásának $320 \mu m$ hullámhosszon mérhető transmissio fokozódása alapján történi.

Ezzel az eljárással a normál szérum UF két, a hypoxiás szérum 5 aktív, azaz hidegen redukáló frakciót adott. Ezeknek az egyes jellemzői a következők:

Anyag*	Frakció	pH	O. D.	Kar	Na ⁺
Normális szérum UF	I.	8,5	32,5	0,26	915
	II.	8,4	1,5	0,38	196
Hypoxiás szérum UF	I.	8,2	35	0,21	306
	II.	7,7	41	0,30	3220
	III.	8,0	5	0,40	385
	IV.	8,0	6	0,44	107
	V.	8,7	15	0,56	105

Jelzések*: O. D. reduktív aktivitás
Kar volumetrikus megoszlási koeff.
Na⁺ nátrium koncentráció mEq/l

Az így kapott frakciókból:

1. Papír- és vékonyrétegchromatographiát,
2. Spektrumvizsgálatokat és
3. Biológiai aktivitás vizsgálatokat végeztünk.

Ezek eredményei röviden a következők:

Papírchromatographiával (Whatman No 3, ethanol: ecetsav : víz = 12 : 2 : 5 futtatással K-ferricyanid reakcióval a normál I., a hypoxiás szérum UF I., II. és V. frakciója adott foltot sorrend szerint 0,71, 0,87, 0,73 és 0,55 Rf értékkel. A fent jelzett foltok helyén ninhydrinnel csak a hypoxiás szérum UF V. frakciójával kaptunk foltot. Cukor, phtálsav, anilin, butanol és Drägendorf előhívók foltot nem adtak.

Vékonyrétegchromatographiával a fent vázolt etanol : víz = 80 : 20 futtatóval K-ferricyanid előhívással valamennyi aktív frakció foltot adott a következő Rf értékkel: Hypoxiás: 0,14, 0,58, 0,32, 0,50 és 0,25; Normál: 0,60, és 0,47, 0,58. Megjegyzendő egyébként, hogy a normál I. és hypoxiás II. frakcióban 0,60, 0,58 Rf-nél a többiektől eltérő intenzív rozsdaszerű barnássárga folt jelentkezett.

Ascorbinsav, glukóz és húgysavval történt párhuzamos futtatás alapján egyedül a hypoxiás szérum V. frakciója esetében valószínű, hogy a kapott folt helyén húgysav van jelen, de u. itt egyben ninhydrin pozitívítás is kimutatható volt.

Biológiai aktivitás-vizsgálatok szérum ultrafiltrátumok chromatographiás frakcióival. Valamennyi normális és hypoxiás szérumból származó aktív frakcióval:

1. a vörösvérsejtek O_2 -affinitásának változását,
2. a vörösvérsejtek oxydánsokkal való haemolysissel szembeni védőhatását és
3. véralvadási-test vizsgálatot (prothrombin idő és partialis thromboplastin aktivitás) végeztünk.

Valamennyi vizsgált frakció közül egyedül a hypoxiás szérum UF II. frakciót találtuk biológiailag aktívnak, mégpedig egyedül a véralvadási testekkel.

Megbeszélés

Ismertetett vizsgálataink több irányból való megközelítéssel igazolják, hogy klinikai és experimentalis hypoxiás állapotokban a szérum fehérjementes ultrafiltrátuma különböző modelleken a kontrollokhöz képest megváltozott biológiai aktivitást fejt ki. Az inzulinaktivitást, enzyme aktivitását, a vörösvérsejtek egyes alapvető funkcióit érintő stb. hatás milieu-szerű, így feltehetően az egész szervezetben érvényesül.

Az ismertetett eredmények szerint, továbbá saját egyéb adataink és mások közlései alapján jogos annak a hypothesisnek a felvetése, hogy mindez az új homeostatikus tényezőnek a következménye, amelynek megjelölésére a homeostatikus redox egyensúly (HRE) rendszer elnevezést ajánljuk. A redukciós túlsúly ennek a HRE-rendszer zavarának a következménye.

A feltevés igazolására irányuló követelmények között elsősorban vetődik fel annak szükségessége, hogy pontosan definiáljuk a hatásért felelős anyagokat. Ezt a munkát még eddig nem volt módunkban elvégezni, csupán arra törekedhettünk, hogy a hypoxiás szérum-ultrafiltrátumok természetét jellemezzük. A hatásért felelős anyagok pontos identifikálására tovább is törekednünk kell.

További haladás várható annak tisztázásából, hogy a hypoxiás szérumok spektroszkopos eltérésekkel és fokozott redukciós aktivitással jellemezhető tulajdonsága mely szervekből ered.

Az általunk észlelt hatások a hypoxia következtében felborult biológiai egyensúly végső stadiumának az eredői. A részletekre fény derülhet sejtanycsere-gátlók segítségével az anyagcsere utaknak korábbi szakaszaiban való vizsgálatából. De a jelenségek hátterében a feltételezett HRE-zavar valószínűen nem is specifikus olyan értelemben, hogy különböző összetételű, de redox hatás tekintetében hasonló anyagok hasonló eltérést okozhatnak. Amint korábban kifejtettük (Boda 1957), elgondolásunk szerint a HRE-rendszer a sav–bázis egyensúly rendszerrel analóg jelenség. Az oxydo-redukciós folyamatok során elektronáramlásról van szó. A H^+ -ion koncentráció szervezeten belüli stabilitása pedig lényegében a protonáramlás dinamikus egyensúlya. Utóbbiban többféle anyag hatásának ugyanolyan következménye lehet a H^+ -koncentráció szervezeten belüli eltolódása. Ilyen értelemben az általános jellegű redox-hatás további tanulmányozása is indokolt, sőt meg van a létjogosultsága ismert gyógyszerek, biológiailag aktív vegyületek ilyen szempontból való vizsgálatának, továbbá ugyancsak redox hatáson alapuló terápiás kísérleteknek is.

Az ismertetett vizsgálatokban számos munkatárs volt segítségemre.

A régebbi munkák egy részében Ébrey Pirooska működött közre.

A HRE-rendszer biológiai hatásaira vonatkozó vizsgálatok többségében Eck Erna dr., Virág István dr., Román Ferenc dr. és Szilágyi Magda vett részt. A túlélő szerveken való vizsgálatokat Gábor Miklós dr. irányításával Dr. Bogdánne Magyarlaci Anna dr. végezte. A hypoxiás ultrafiltrátumok jellemzésére irányuló munkákban ismét Eck Erna dr. és Havass Zoltán dr. vegyészek vállaltak nagy részt.

A munka szinte valamennyi szakaszában, mind a vizsgálatok irányának megkeresésében, mind a tervezésben, továbbá magában a munkában Murányi László dr.-nak vannak jelentős érdemei.

Összefoglalás

Korábbi vizsgálatainkban heveny klinikai kórképekben és kísérletes hypoxiás állapotokban a szérumban kimutatott fokozott redukzív aktivitás és ennek biológiai hatásai alapján felvetettük annak valószínűségét, hogy heveny anyagcserezavarokban a kóros történéseket még egy homeostatikus tényező: a pro- és antioxydánsok egyensúlyának eltolódása is meghatározza.

Ismertetjük annak az újabb vizsgálatsorozatnak az eredményeit, amelyet a kérdés több oldalról való megközelítésére végeztünk.

A szérum fokozott redukzív aktivitása, annak fehérjementes ultrafiltrátumában változatlan mértékben kimutatható. A fokozott redukzív aktivitás állatkísérletben hypoxiával kísérletesen is létrehozható.

Különböző kísérleti modellekben a jelenséggel összefüggésben a következő biológiai hatásokat mutattuk ki.

1. Hypoxiás szérumokban az inzulinaktivitás gátolt, a gátlás oxydás hozzáadásával ellensúlyozható.

2. Hypoxiás szérumok ultrafiltrátuma jódozással részlegesen inaktivált tejsavdehydrogenase, coeruleoplasmín, acethylcholinesterase és ribonuclease enzimek aktivitását módosítani képes.

3. A hypoxiás szérum ultrafiltrátumban a vörösvérsejtek oxygenaffinitását fokozó hatás mutatható ki.

4. A fokozott redukív aktivitású szérumok ultrafiltrátuma *in vitro* befolyásolja az egyes véralvadási rendszereket,

5. és a vörösvérsejtek oxydatív haemolysise gátlásával antioxydás hatást fejt ki.

6. Kísérleti és klinikai viszonyok között a hypoxiás állapotokban dialysissel therapiás hatás érhető el.

Ismertettük azokat a vizsgálatokat, amelyekben ultraibolya spektrum vizsgálatával, oxydásokkal való reakció kinetikája alapján, vékonyréteg- és oszlophromatographiával a hypoxiás szérum fehérjementes ultrafiltrátumának egyes tulajdonságát jellemeztük.

IRODALOM

- Bernheim, F.: Rad. Res. Suppl. **3**, 17 (1963).
 Boda, D.: Kísérl. Orvostud. **9**, 185 (1957).
 Boda, D.: Kísérl. Orvostud. **9**, 239 (1957).
 Boda, D.: Orvosi Hetil. **114**, 423 (1973).
 Boda, D. és Kiss, S.: Helv. Paediat. Acta **10**, 17 (1955).
 Boda, D. és Kiss, S.: Acta Paediat. Scand. **46**, 177 (1957).
 Boda, D., Murányi, L., Bélay, M., Ébrey, P. és Eck, E.: Pediat. Res. **1**, 411 (1967).
 Boda, D., Murányi, L., Bélay, M. és Eck, E.: Life Sci. **1**, 8, 1009 (1969).
 Boda, D., Murányi, L., Altorjay, I. és Veress, I.: Acta Paediat. Scand. **60**, 90 (1971).
 Boda, D., Murányi, L. és Eck, E.: Transact. XIII. Internat. Congr. Paediat. Vienna **1**, 125 (1971).
 Chance, B., Cohen, P., Jobsis, F. és Schoener, B.: Science **137**, 499 (1962).
 Csapó, J., Nyerges, G. és Budai, J.: Orvosi Hetil. **107**, 2406 (1966).
 Eldjarn, L.: The clinical biochemistry of divalent sulfur.
 Eldjarn, L.: The clinical biochemistry of divalent sulfur. X. Meeting of Scand. Soc. for Clin. Chem. and Clin. Physiol. (1965) P. 7.
 Ferencz, P. és Boda, D.: Ann. Paediatrici **175**, 459 (1950).
 Gerlóczy, F.: Orvosi Hetil. **114**, 2821 (1973).
 Haugard, M.: Physicol. Rev. **48**, 311 (1968).
 Kovách, A. G. B. és Sándor, P.: Adv. Exer. Med. a Biol. **33**, 243 (1973).
 Pálos, L. Á.: Dynamikus egyensúlyállapotok és oxydo-reductiós folyamatok a véralvadás mechanizmusában. Doktori értekezés MTA (1964).
 Pappi, A., Tigyi, A. és Szalay, L.: Acta Physiol. Ac. Sci. Hung. **41**, 199 (1972).
 Rabotnova, I. L.: Die Bedeutung physikalisch-chemischer Faktoren (pH und rH₂) für die Lebenstätigkeit der Mikroorganismen. Ed. Fischer. Jena (1963).
 Robin, E. D. és Theodore, J.: Med. Clin. N. Amer. **57**, 563 (1973).
 Shapiro, H. M.: J. Surg. Res. **3**, 138 (1972).
 Shapiro, H. M., Markley, K. és Smallman, E.: Proc. Exper. Biol. a Med. **142**, 968 (1973).
 Ziegler, E.: Messung und Bedeutung des Redoxpotentials im Blut in vivo und in vitro. Arzneimittelforschung. Beiheft 10. (1960).
 Virág, I. és Boda, D.: Pediat. Res. **6**, 57 (1972).