

ANDRZEJ JASIŃSKI. WŁODZIMIERZ TYBURCZYK

MIKROMETODA KOLORYMETRYCZNA
OZNACZANIA AKTYWNOŚCI ADRENALINOOKSYDAZ
W OSOCZU KRWI

Z Zakładu Patologii Ogólnej i Doświadczalnej AM w Lublinie
Kierownik: prof. dr *J. Billewicz-Stankiewicz*

Z Pracowni Fizjopatologii (Kierownik: prof. dr *J. Billewicz-Stankiewicz*)
Instytutu Medycyny Pracy i Higieny Wsi w Lublinie
Dyrektor: prof. dr *J. Parnas*

Metabolizm adrenaliny i noradrenaliny od dość dawna przyciąga uwagę wielu badaczy. Szczególnie ważną rolę odgrywa tu mechanizm inaktywacji tych hormonów w ustroju.

Inaktywacja może przebiegać drogą ustalenia enzymatycznego i reakcji nieenzymatycznych. Reakcje enzymatyczne i nieenzymatyczne mogą przebiegać następująco:

1. Utlenienie grupy aminowej przez aldehyd 3,4-dwuhydroksyfenyloglikolowy do kwasu 3,4-dwuhydroksyfenyloglikolowego.
2. Utlenienie grup hydroksylowych i zamknięcie pierścienia indolowego przez adrenochinon lub leukoadrenochrom do adrenochromu i melaniny.
3. Metylacja m-grupy hydroksylowej i ewentualnie dalsze utlenienie grupy aminowej przez metoksyadrenalinę do kwasu 3-metoksy-4-hydroksyfenyloglikolowego.
4. Ekstryfikacja p-grupy hydroksylowej głównie kwasami siarkowym i glukuronowym.
5. Addycja aldehydów z grupą aminową.
6. Utlenienie grupy hydroksylowej łańcucha bocznego pod wpływem dehydrogenazy adrenaliny do adrenalonu, a następnie utlenienie grupy aminowej adrenalonu przez 3,4-dwuhydroksyfenyloglioksal do kwasu 3,4-dwuhydroksyfenyloglioksalowego, który pod wpływem dekarboksylazy przechodzi w aldehyd pirokatechinowy, a ten ulega z kolei utlenieniu do kwasu pirokatechinowego.

W dotychczasowej dostępnej nam literaturze spotkaliśmy wiele prac

zajmujących się enzymatycznym utlenieniem adrenaliny. Niestety wśród autorów panuje pewien chaos, jeśli chodzi o nazwę tych enzymów jak i sposób ich działania. W związku z tym, opierając się na pracach dotychczasowych [1, 2, 3, 16, 17, 18] i badaniach własnych ułożyliśmy następujący podział czynników inaktywujących adrenalinę:

A. Utleniające do adrenochromu.

I. Enzymatyczne.

a) Miedzioproteidy: 1) monofenoloksydaza (tyrozynaza), 2) polifenoloksydaza (ceruloplazmina, lakkaza).

b). Żelazoproteidy: 1) peroksydaza, 2) ferrytyna, 3) oksydaza cytochromowa (cytochrom a_3).

II. Nieenzymatyczne.

1) Jony metali ciężkich.

B. Utleniające grupę aminową.

I. Enzymatyczne.

1) Monoaminoksydaza.

C. Reakcje różne (działanie enzymatyczne czy też nieenzymatyczne dotychczas nie całkowicie wyjaśnione).

1) Tworzenie metoksy-pochodnych — prawdopodobnie na skutek działania katecholo-o-metylotransferazy.

2) Wbudowanie do białek.

3) Przyłączanie aldehydów.

4) Estryfikacja.

Z pośród wyżej wymienionych inaktywatorów adrenaliny największe działanie katalizujące wywierają: polifenoloksydaza (ceruloplazmina), monoaminoksydaza, oksydaza cytochromowa oraz jony metali ciężkich. Działanie pozostałych czynników jest bardzo znikome i praktycznie przy oznaczaniu 4 powyższych katalizatorów w osoczu krwi *in vitro* nie odgrywa żadnej roli [16, 18].

Celem niniejszej pracy jest oznaczenie aktywności polifenoloksydazy (ceruloplazminy) łącznie z monofenoloksydazą (tyrozynazą), monoaminoksydazy i oksydazy cytochromowej oraz wpływu metali ciężkich w małych ilościach osocza krwi, przy użyciu jako substratu adrenaliny.

Z dotychczas znanych prac jedną z najstarszych jest metoda *Zellera* przy użyciu metody manometrycznej *Warburga*. Metoda ta jest mało dokładna i skomplikowana, obejmująca ogólnie oksydazy. Jednym z pierwszych badaczy, który próbował rozdzielić działanie na adrenalinę poszczególnych oksydaz jest *Pekkarinen*. Oznaczając aktywność oksydazy cytochromowej i aminoksydazy pomija on działanie polifenoloksydazy oraz nie bierze pod uwagę tworzenia się melaniny. *Humoller* w swojej pracy myli aminooksydazę (wyrażając jej aktywność w jednostkach ceruloplazminy) z polifenoloksydazą, przy czym używa jako substratu dwuetylo-

parafenylenodwuaminy, czego nie można odnieść całkowicie ilościowo do działania enzymu na adrenalinę. Substratu p-fenylenodwuaminy używa Kościelak przy elektroforetycznym oznaczaniu aktywności ceruloplazminy posługując się metodą Ravina. Leach z kolei w swojej pracy nie bierze pod uwagę samoistnego rozpadu adrenaliny, oraz wpływu metali ciężkich, przy czym oznaczając aktywność całej grupy enzymatycznej utleniającej adrenalinę do adrenochromu podaje ją jako ceruloplazminę. Nakajima, używając wyodrębnionych enzymów stwierdził, że transferyna nie utlenia adrenaliny *in vitro*, natomiast tyrozynaza (monofenoloksydaza) znacznie silniej utlenia adrenalinę *in vitro*, niż wyodrębniona ceruloplazmina szczególnie przy wyższych wartościach pH (do 100 razy przy pH 7,4), co jednakże przeczy założeniom klasyfikacji enzymów, gdyż monofenoloksydaza (tyrozynaza) wykazuje niskie powinowactwo do polifenoli, jakim jest adrenalina. Być może błąd tkwi tutaj w samych preparatach ceruloplazminy i tyrozynazy, jakimi posługiwał się Nakajima, który nie uwzględnił także tworzącej się w procesie utleniania melaniny, ani roli monoaminooksydazy.

Wszystkie powyższe metody charakteryzuje oprócz tego duża ilość materiału wyjściowego, najmniej 1 ml surowicy, uniemożliwiająca pobranie materiału od małych zwierząt doświadczalnych i z palca od człowieka.

Zaletami niżej opisanej przez nas metody jest mała ilość materiału wyjściowego (od 0,02 ml do 0,12 ml pełnej krwi w zależności od tego czy oznacza się wszystkie enzymy czy tylko jeden) oraz prosta aparatura i tok postępowania.

Poszczególne grupy enzymów oznaczano drogą różnicowania, oznaczając kolorymetrycznie jako produkt końcowy różowo zabarwiony adrenochrom. Różnicowanie to przeprowadzano blokując działanie poszczególnych katalizatorów organicznych i nieorganicznych przez odpowiednie substancje chemiczno-farmakologiczne jak: cjanek potasu, wersanian sodu, iproniazyd. Działanie tych inhibitorów znane jest od dawna i szeroko opisane w literaturze [9, 14, 16].

METODYKA

Odczynniki. 1. Bufor fosforanowy izotoniczny o pH 6,00 [12]. 2. 50 mg% roztwór adrenaliny (50 mg adrenaliny rozpuszcza się w 10 ml 0,1 N HCl i uzupełnia wodą do 100). 3. 0,25% roztwór żelazicjanku potasu. 4. 4% roztwór wersnianu sodu. 5. 10 mg% roztwór cjanu potasu. 6. 0,4% roztwór iproniazidu (marsylidu). 7. 3% roztwór wody utlenionej. 8. 0,2% roztwór azydki sodu. 9. 0,05 N HCl.

Aparatura. Fotometr Pulfricha. Ultratermostat Höpplera.

Oznaczenie. Do próbki wirówkowej o pojemności 20 ml odpipetowuje się 16 ml buforu fosforanowego pH — 6,00 i 0,16 ml pełnej krwi (lub odpowiednio mniej, gdy oznacza się mniej enzymów) pobranej z palca. Zawartość próbki wiruje się przez

5 minut przy 3000 obr./min. Płyn z nad krwinek dekantuje się. Do 9 probówek odpietowuje się kolejno (tab. 1):

Tabela 1

	A	B	C	D	E	F	G	S	H
Bufor pH-6,00 1)	0,4	0,3	0,3	0,2	0,2	0,1	—	2,4	2,3
Bufor z osczem 2)	2	2	2	2	2	2	2	—	—
Wersenian sodu 3)	—	—	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	—	—
Cjanek potasu 4)	—	—	—	—	0,1	0,1	0,1	—	—
Iproniazyd 5)	—	—	—	—	—	—	0,1	—	—

Buffer pH 1); Buffer with plasma 2); Sodium versenate 3); Potassium cyanide 4); Iproniazid 5).

Do probówek A, B, C, D, E, F, G dodaje się po 0,1 ml adrenaliny i po 2 krople wody utlenionej i inkubuje się przez 30 minut w temp. 37°C w ultratermostacie Höpplera. Przed samym oznaczeniem dodaje się do probówki S 2 krople wody utlenionej i 0,1 ml żelaziczjanku potasu, a do probówki H 0,1 ml roztworu adrenaliny, 2 krople wody utlenionej i 0,1 ml żelaziczjanku potasu. Celem sprawdzenia, czy w związku z używaniem wody utlenionej nie ma się do czynienia z aktywnością peroksydazy, przeprowadzono badania w warunkach identycznych, jakich używaliśmy w niniejszej pracy nad aktywnością enzymatyczną oscza.

Przeprowadzone próby (przy użyciu benzydiny) stwierdziły, że w tych warunkach aktywność peroksydazy oscza nie istnieje. Również w dostępnej nam literaturze nie znaleźliśmy wzmianek o istnieniu peroksydazy w osczu.

Po inkubacji dodaje się do probówek: B, D, F, G po 0,1 ml żelaziczjanku potasu. Do wszystkich probówek dodaje się po 0,1 ml roztworu azydku sodu w celu zahamowania reakcji enzymatycznych i po 0,1 ml 0,05 N HCl w celu stabilizacji utworzonego adrenochromu i kolorymetruje się na fotometrze Pulfricha w mikrokuwetach 5 cm o objętości nie większej niż 2 ml przy użyciu filtru o maks. absorpcji 500 m μ wobec buforu. Wartości rozłożonej adrenaliny poszczególnych probówek wylicza się według wzoru:

$$\frac{50 \cdot E}{E_H}$$

E = wartość ekstynkcji próbki badanej, E_H = wartość ekstynkcji próbki S lub odczytuje się z krzywej kalibracji.

Aktywność enzymatyczną poszczególnych enzymów wylicza się według wzorów:

Rozkład nieenzymatyczny D — B + A — C

Poli- i monofenoloksydaza H — G + E

Oksydaza cytochromowa C — E + F — D

Monoaminooksydaza G — F

Nieutleniona adrenalina B — (S + A).

Sporządzanie krzywej kalibracji.

Do 8 probówek odpipetowuje się po 1 ml roztworu adrenaliny o zawartości: 1, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 gamma adrenaliny, 1,5 ml buforu fosforanowego pH — 6,00, 0,1 ml żelazicjanku potasu, 2 krople wody utlenionej i po 2 minutach dodaje się do wszystkich probówek po 0,1 ml roztworu azydku sodu i 0,1 ml 0,05 N HCl. Do próby ślepej dodaje się zamiast adrenaliny czysty bufor i resztę odczynników jak wyżej. Wartość ekstynkcji próby ślepej odejmuje się od wartości ekstynkcji poszczególnych próbek. Krzywą wykreśla się przez oznaczenie na osi rzędnych ilości adrenaliny w gamma, a na osi odciętych wartości ekstynkcji.

Obliczanie aktywności poszczególnych enzymów.

Jeżeli oznaczymy ogólną ilość dodanej adrenaliny przez H. Utlenienie nieenzymatyczne do adrenochromu n_a

„ „ do melaniny n_m

„ „ przez oksydazę cytochromową do adrenochromu c_a

„ „ przez oksydazę cytochromową do melaniny c_m

„ „ przez poli- i monofenoloksydazę do adrenochromu f_a

„ „ przez poli- i monofenoloksydazę do melaniny f_m

„ „ przez monoaminoksydazę a

Pozostałą ilość wolnej adrenaliny w

to:

w próbce A zmierzmy adrenochrom powstały z utlenienia nieenzymatycznego oraz utlenienia przez oksydazę cytochromową i poli- i monofenoloksydazę.

$$\text{Próbka A} = n_a + c_a + f_a$$

W próbce B po dodaniu żelazicjanku potasu będziemy mieli to samo co w próbce A i wolną adrenalinę.

$$\text{Próbka B} = n_a + c_a + f_a + w$$

W próbce C przez zablokowanie wersenianem sodu metali ciężkich zmierzmy adrenochrom powstały z utlenienia adrenaliny przez oksydazę cytochromową i poli- i monofenoloksydazę.

$$\text{Próbka C} = c_a + f_a$$

W próbce D po dodaniu żelazicjanku potasu będziemy mieli to samo co w próbce C, wolną adrenalinę oraz tę ilość wolnej adrenaliny, z której, gdyby nie było wersenianu powstałby adrenochrom n_a i melanina n_m .

$$\text{Próbka D} = c_a + f_a + w + n_a + n_m$$

W próbce E przez zablokowanie utleniania nieenzymatycznego oraz oksydazy cytochromowej cjankiem potasu będzie tylko adrenochrom powstały z utlenienia adrenaliny przez poli- i monofenoloksydazę.

$$\text{Próbka E} = f_a$$

W próbce F będzie to samo co w próbce E, lecz po dodaniu żelazicjanku potasu utleniona adrenalina będzie zawierać adrenalinę w , adrenalinę nieutlenioną przez metale ciężkie do adrenochromu n_a i do melaniny n_m oraz adrenalinę nieutlenioną przez oksydazę cytochromową do adrenochromu c_a i do melaniny c_m .

$$\text{Próbka F} = f_a + w + n_a + n_m + c_a + c_m$$

W próbce G będzie to samo co w próbce F, lecz dojdzie jeszcze adrenochrom powstały z adrenaliny nieutlenionej przez monoaminooksydazę na skutek zablokowania jej iproniazydem.

Próbka $G = F_a + w + n_a + n_m + c_a + c_m + a$

Próbka H zawiera całą ilość dodanej reakcji adrenaliny, od której po odjęciu zabarwienia dodanego żelaziejanku potasu (próbka S) otrzymuje się 50 gamma adrenaliny.

Z wyżej podanych wzorów wynika:

$G - F = a$ (aktywność monoaminooksydazy),

$D - B = n_m$ (utlenienia nieenzymatyczne do melanin),

$A - C = n_a$ (utlenienie nieenzymatyczne do adrenochromu),

$H - G = f_m$ (utlenienie przez poli- i monofenoloksydazę do melaniny),

$E = f_a$ (utlenienie przez poli- i monofenoloksydazę do adrenochromu),

$C - E = c_a$ (utlenienie przez oksydazę cytochromową do adrenochromu),

$F - D = c_m$ (utlenienie przez oksydazę cytochromową do melaniny),

$B - A = w$ (ilość nieutlenionej adrenaliny).

Ponieważ w tym wypadku różnicujemy próbki z żelaziejankiem potasu i bez żelaziejanku potasu, należy jeszcze odjąć od próbki B wartości próbki S to:

$$w = B - (A + S)$$

Z wzorów tych wynika że:

Utlenienie nieenzymatyczne = $D - B + A - C$

Aktywność poli- i monofenoloksydazy = $E + H - G$

Aktywność oksydazy cytochromowej = $C - E + F - D$

Aktywność monoaminooksydazy = $G - F$

Ilość nieutlenionej adrenaliny = $B - (A + S)$.

Ogólna ilość rozkładu adrenaliny przez osocze krwi po dodaniu adrenaliny nieutlenionej powinna wynosić 50 gamma (ryc. 1).

Ponieważ w naszych odznaczeniach nie stwierdziliśmy w osoczu krwi ludzkiej działania nieczynniającego adrenaliny przez monoaminooksydazę (wartości przez nas uzyskane leżały w granicach błędu metody), dlatego aktywność pozostałych enzymów można określić na podstawie tylko 6 próbek:

A, B, C, E, S, H, gdzie:

utlenienie do adrenochromu przez poli- i monofenoloksydazę = E

utlenienie do adrenochromu przez oksydazę cytochromową = C - E.

Utlenienie do adrenochromu przez jony metali ciężkich = A - C. Ogólną ilość adrenochromu, który przeszedł w melaninę 50 - B + S. Z ilości tej można obliczyć utlenienie do melaniny przez poszczególne enzymy wg wzorów:

$$\frac{(50 - B + S) \cdot (A - C)}{A} \quad \text{dla jonów metali ciężkich}$$

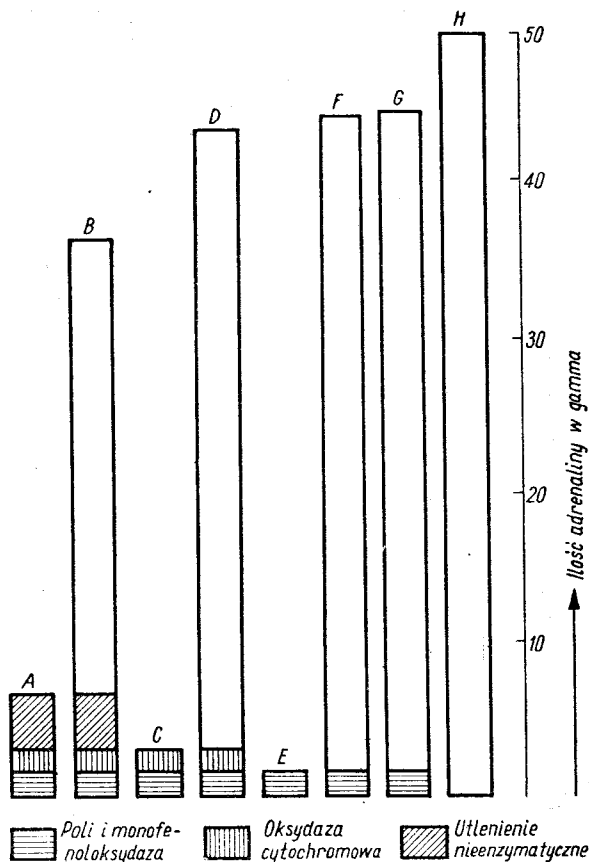
$$\frac{(50 - B + S) \cdot E}{A} \quad \text{dla poli- i monofenoloksydazy}$$

$$\frac{(50 - B + S) \cdot (C - E)}{A} \quad \text{dla oksydazy cytochromowej.}$$

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Przy opracowaniu mikrometody oznaczania adrenalinoooksydaz w osoczu krwi koniecznym było użycie jak najmniejszej ilości krwi oraz ustalenie optymalnych warunków nieczynnienia adrenaliny. Zmusiło nas to do przebadania poszczególnych parametrów jak: temperatura, stężenie buforu, pH środowiska, czas inkubacji i stężenie substratu.

Ilość materiału wyjściowego w opisanej przez nas metodzie wahała się od 0,02 do 0,12 ml pełnej krwi, w zależności od tego czy oznacza się wszystkie enzymy, czy tylko jeden. Ta mała ilość krwi umożliwia prowadzenie badań na małych zwierzętach doświadczalnych. Badania prze-



Ryc. 1. Diagram przedstawiający ilość utlenionej adrenaliny w poszczególnych próbkach A, B, C, D, E, F, G i H. Pola odpowiednio zakreskowane przedstawiają działanie poszczególnych enzymów i działanie utleniania nieenzymatycznego, natomiast pole niezakreskowane przedstawia ilość adrenaliny utlenionej przez żelazicianek potasu.

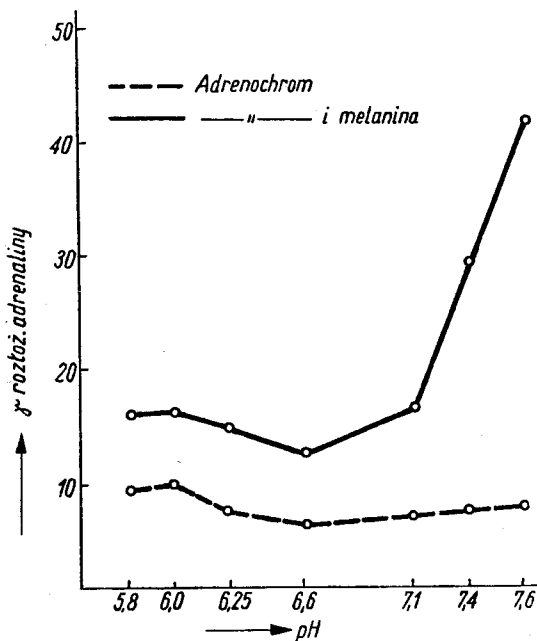
Fig. 1. Diagram representing the quantity of adrenaline oxidized in samples A, B, C, D, E, F, G, and H. The differently dashed areas represent the action of the various enzymes and non-enzymatic oxidation: the unshaded area shows the amount of adrenaline oxidized by potassium ferricyanide.

prowadzaliśmy w 37°C. Krew dodawaliśmy do buforu fosforanowego o stężeniu izotonicznym. Przebadałmy aktywność enzymatyczną osocza w zakresie pH 5,8—7,6. Maksimum utlenienia do adrenochromu zachodziło w pH — 6,0 Środowisko zasadowe katalizuje do dalszego silniej-

szego utlenienia adrenaliny do melaniny. Ze względu na najbardziej korzystne warunki oznaczania w maksimum utlenienia adrenaliny do adrenochromu badania przeprowadzono w $\text{pH} = 6,0$ (ryc. 2).

Przebadaliśmy zależność aktywności enzymatycznej osocza od czasu inkubacji (ryc. 3).

W miarę wzrostu czasu inkubacji wartości ślepych prób malały. Jednakże w pierwszych 10 minutach inkubacji szybkość utlenienia w próbie ślepej była wyższa niż w próbie badanej. Odnosi się wrażenie, że w osoczu



Ryc. 2. Zależność utleniania adrenaliny od pH środowiska.

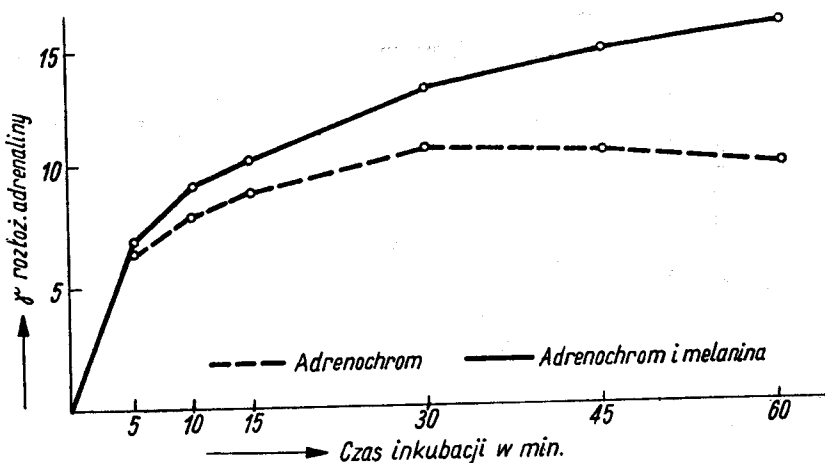
Fig. 2. The relation between oxidation of adrenaline and pH of the medium

znajdują się pewne czynniki chroniące adrenalinę przed utlenieniem nieenzymatycznym. W dalszych minutach wartości prób ślepych malały wskutek dalszego utlenienia adrenochromu do bezbarwnych związków, stanowiących produkt pośredni w powstawaniu melanin. Podczas jednogodzinnej inkubacji optimum utlenienia adrenaliny do adrenochromu było w 30 minucie. Szybkość utlenienia adrenaliny u poszczególnych osobników była różna, a optimum było między 15 a 45 min. Ilość unieczynnionej adrenaliny przez osocze krwi wahała się w granicach 15 a 25 mikrogramów adrenaliny po 30 minutach inkubacji. W miarę wzrostu czasu inkubacji ilość unieczynnionej adrenaliny przez osocze wzrasta. Czas inku-

bacji ustalono na 30 minut, w tym bowiem czasie osiąga się optimum utlenienia adrenaliny do adrenochromu.

Przebadano zależność aktywności poszczególnych enzymów od ilości dodanego substratu (ryc. 4).

Aktywność oksydazy cytochromowej nieznacznie zmniejsza się w miarę zwiększania ilości dodanej adrenaliny. Aktywność oksydaz fenolowych wzrasta powoli, osiągając maksimum przy 20 gamma dodanej adrenaliny i dalszy dodatek adrenaliny nie wpływa już na zmianę ich aktywności. Utlenienie nieenzymatyczne wzrasta szybko osiągając swoje optimum przy 30 gamma dodanej adrenaliny. Ilość utworzonej melaniny wzrasta

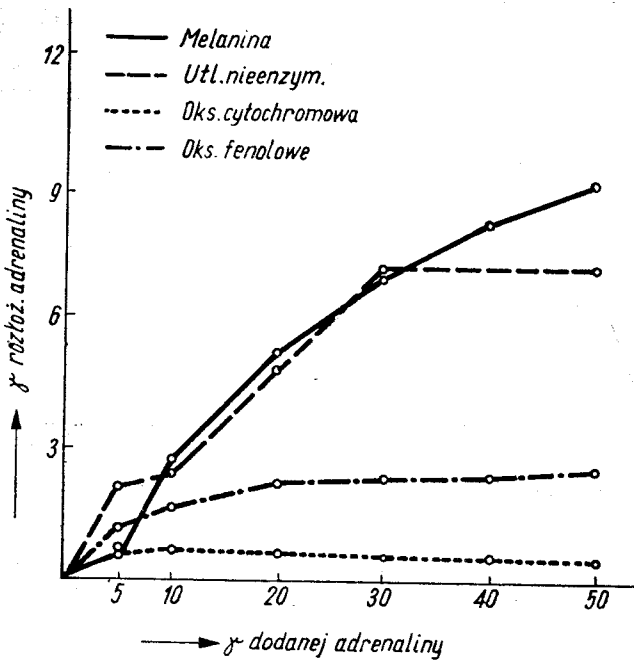


Ryc. 3. Zależność aktywności enzymatycznej osocza od czasu inkubacji.
Fig. 3. Relation of enzymatic activity of the plasma to the time of incubation.

w miarę wzrostu ilości dodanej adrenaliny. Do badań używano 50 γ adrenaliny jako ilość naszym zdaniem optymalną. Na podstawie badań własnych można przypuszczać, że utlenienie adrenaliny przez ciała katalizujące osocza następuje głównie w kierunku adrenochromu według drugiego typu reakcji. Utlenienie to przebiega prawdopodobnie przez stadium pośrednie czego dowodem jest stosunkowo powolne utlenienie adrenaliny do adrenochromu żelaziczankiem potasu. Pewien wpływ ma tu również pH środowiska. Nie można dokładnie określić, czy produktem przejściowym jest adrenochinon, który przez utworzenie pierścienia indolowego przechodzi w adrenochrom, czy następuje tu wpierw zamknięcie do układu indolowego z wytworzeniem leukoadrenochromu, a następnie przejście do adrenochromu. Wytworzony adrenochrom w zależności od pH środowiska przechodzi szybciej lub wolniej w oksoadrenochrom związek bezbarwny, który jest prawdopodobnie monomerem melaniny. Poli-

meryzacja jego do melaniny, związku o brunatnym zabarwieniu jest bardzo powolna (kilka tygodni). Zależność szybkości przechodzenia adrenochromu w oksoadrenochrom od pH ilustruje ryc. 5.

W miarę wzrostu pH zwiększa się szybkość przechodzenia adrenochromu w oksoadrenochrom. Środowisko kwaśne stabilizuje wytworzony adrenochrom. Ponieważ metoda oznaczania aktywności adrenalinoooksydazy oparta jest na mierzeniu ekstynkcji różowo zabarwionego adrenochromu stabilność wytworzonego adrenochromu osiąga się przez dodanie do pró-

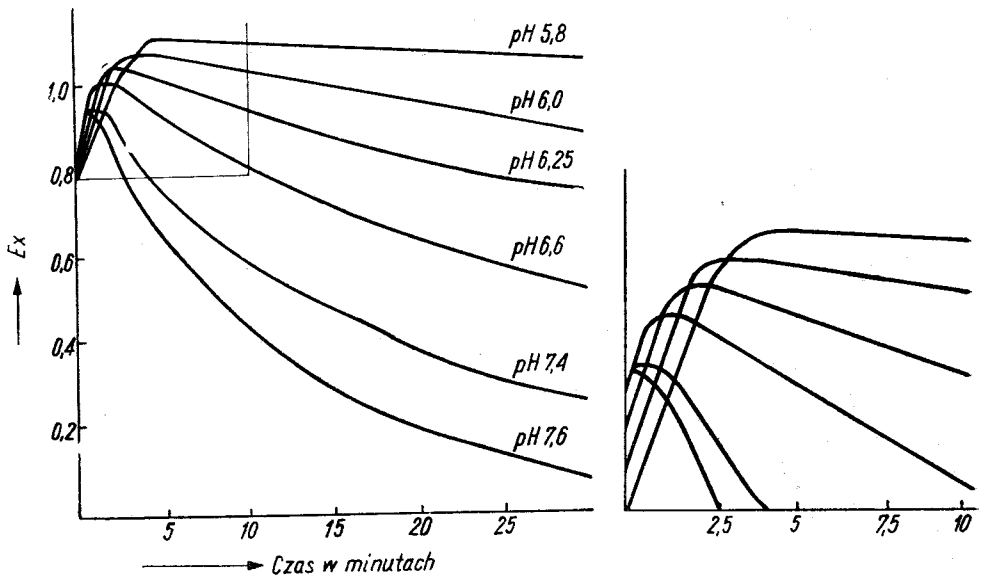


Ryc. 4. Zależność aktywności poszczególnych enzymów od ilości dodanego substratu (adrenaliny).
Fig. 4. Relation of activity of the various enzymes to the quantity of substrate (adrenaline) added.

bek 0,1 ml 0,05 NHCl, czyli przez zakwaszenie środowiska. Zakwaszenie to musi nastąpić po utworzeniu adrenochromu, dlatego w próbkach, w których utleniamy adrenalinę żelazicjankiem potasu dodaje się roztwór HCl po 2 minutach od dodania żelazicjanku potasu.

Liczba osób, u których oznaczano aktywność enzymatyczną osocza krwi (10 osób) jest zbyt mała by można było dokładnie ustalić normy aktywności poszczególnych enzymów. Jest jednak godne uwagi, że u wszystkich badanych aktywność monoaminooksydazy w stosunku do adrenaliny była tak mała, że leżała w granicach błędu metody. Nie wiadomo, czy mono-

aminooksydaza osocza ludzkiego ma istotne znaczenie w inaktywacji adrenaliny. Dotychczasowe prace dotyczące oznaczania aktywności monoaminooksydazy w osoczu krwi były oparte bądź to na zastosowaniu innych substratów jak: p-fenylenodwuamina lub N,N-dwumetylo-p-fenylenodwuamina, bądź też nie brano pod uwagę bardzo szybko tworzącego się z adrenochromu monomeru melanin. Odrębnym zagadnieniem jest zdolność unieczynnienia adrenaliny przez płuca jelita, nerki i trzustkę. Zachodzi więc potrzeba badań na tkankach. Ciekawe byłoby zastosowanie jako substratu noradrenaliny.



Ryc. 5. Zależność szybkości przechodzenia adrenochromu w substancję macierzystą melanin (oksoadrenochrom) od pH środowiska.

Fig. 5. Relation of the rate of transformation of adrenochrome into the maternal substance of melanin (oxoadrenochrome) to the pH of the medium.

Dokładność metody oznaczono wielkością średniego błędu pojedynczego pomiaru ze wzoru dla oznaczeń równoległych, gdzie d = różnicy wyników oznaczeń równoległych, n = liczba par oznaczeń równoległych. Z podanego na tabeli 1 zestawienia rezultatów 9 oznaczeń równoległych, osobno dla utlenienia nieenzymatycznego, utlenienia przez fenoloooksydazy i oksydazę cytochromową wynika, że największą dokładność uzyskuje się dla oznaczeń aktywności fenoloooksydaz (1,68%) mniejszą dla utlenienia nieenzymatycznego (4,44%), zaś najmniejszą dla oznaczeń aktywności oksydazy cytochromowej (18,9%). Ten ostatni duży błąd spowodowany jest przede wszystkim nieznaczną aktywnością oksydazy cytochromowej, a tym samym małym jej znaczeniem jeśli chodzi o surowicę ludzką. Przy-

użyciu czulszych aparatów pomiarowych (spektrofotometr) błąd ten będzie odpowiednio mniejszy.

Tabela 2

Nr kol. 1)	Utlenienie nieenzymatyczne 2)		Poli- i monofenolooksydaza 3)		Oksydaza cytochromowa 4)	
1	18,67	17,71	16,47	16,84	2,41	1,80
2	18,67	18,89	16,47	16,68	2,41	1,86
3	18,67	17,36	16,47	16,75	2,41	3,02
4	19,47	17,54	20,18	19,30	2,33	2,05
5	19,47	19,73	20,18	20,13	2,33	2,08
6	19,47	17,56	20,18	20,22	2,33	2,68
7	18,47	18,92	17,42	17,96	1,42	1,69
8	18,47	17,51	17,42	17,12	1,42	2,18
9	18,47	17,86	17,42	17,56	1,42	1,12

Utlenienie nieenzymatyczne 2)

$$\sigma = \pm \sqrt{\frac{\sum d^2}{2(n-1)}} = 0,85$$

średni błąd 5) % = 4,44

Poli- i monofenolooksydaza 3)

$$\sigma = \pm \sqrt{\frac{\sum d^2}{2(n-1)}} = 0,30$$

średni błąd 5) % = 1,68

Oksydaza cytochromowa 4)

$$\sigma = \pm \sqrt{\frac{\sum d^2}{2(n-1)}} = 0,36$$

średni błąd 5) % = 18,91

Expt. No 1); Non-enzymatic oxidation 2); Poly- and Monophenoloxidase 3); Cytochrome oxidase 4); Mean error 5).

A. Ясиньски, В. Тыбурчик

КОЛОРИМЕТРИЧЕСКИЙ МИКРОМЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ АДРЕНАЛИНООКСИДАЗ В КРОВЯНОЙ ПЛАЗМЕ

Содержание

Разработан микрометод определения активности фенолоксидаз, цитохромовой оксидазы, аминоксидазы а также неэнзиматического окисления в кровяной плазме при применении как субстрата адреналина. Отдельные группы энзимов определялись путем дифференциации, на основании колориметрически определяемой розовой окраски адренохрома, являющегося остаточным продуктом реакции. Дифференциация проводилась путем бло-

кировки действия отдельных энзимов соответственными фармаколоого-химическими препаратами как: цианистый калий, версениат натрия, ипрониазид. Для ингибиции энзиматической реакции употребляли азид натрия, а для стабилизации полученного адренохрома применялось закисление среды 0,05 N HCl.

Определения проводились на фотометре Пульфриха в микрокуветках 5 см при применении фильтра при максимум абсорбции 500 мμ в присутствии фосфатового буфера pH — 6,0. Определились оптимальные условия нейтрализации адреналина плазмой крови путем анализа отдельных параметров как: температура, концентрация буфера, pH среды, срок инкубации и концентрации субстрата.

В исследованиях применялся фосфатный буфер изотонических концентраций при pH = 6,0. Инкубация проводилась в температуре 37°C в течении 30 минут. К пробам как субстрат прибавляли адреналин в количестве 50 γ и 2 капли 3% раствора перекиси водорода. Исследования проводились на кровяной плазме человека.

На основании исследований можно предполагать, что окисление адреналина катализаторами плазмы происходит главным образом путем образования адренохрома, который в зависимости от pH среды быстрее или медленнее переходит в меланин. Кислая среда стабилизирует образованный адренохром. Активность моноаминоксидазы была так незначительна, что помещалась в пределах ошибки метода.

Можно предполагать, что моноаминоксидазы кровяной плазмы человека не имеют основного значения при инактивации адреналина.

A. Jasiński, W. Tyburczyk

A COLORIMETRIC MICROMETHOD FOR ESTIMATING ACTIVITY OF ADRENALINE OXIDASES IN BLOOD PLASMA

Summary

A micromethod was developed for estimating activity of phenol oxidases, cytochrome oxidase, aminooxidase, and non-enzymatic oxidation in blood plasma, employing adrenaline as substrate. The different groups of enzymes were determined by means of differentiation and colorimetric estimation of pink-colored adrenochrome as the end-product. Differentiation was carried out by blocking the action of the various enzymes by means of appropriate chemical and pharmacologic agents, such as potassium cyanide, sodium versenate, and iproniazid. The enzymatic reaction was terminated with sodium azide; stabilization of adrenochrome formed was achieved by acidifying the medium with 0.05 N HCl.

The determinations were made with a Pulfrich photometer in 5 cm. microcuvets and a filter with maximum absorption at 500 mμ in phosphate buffer of pH 6.0. The optimum conditions for inactivation of adrenaline by blood plasma were studied by investigating the different parameters such as temperature, concentration of buffer, pH of the medium, time of incubation, and concentration of substrate.

A phosphate buffer of pH 6.0 and isotonic concentration was employed in the investigations. Incubation was carried out at a temp. of 37° during 30 minutes. Adrenaline in amounts of 50 γ, and 2 drops of 3 per cent hydrogen peroxide were added to the samples. The studies were performed with human plasma. On the basis of the results it may be supposed that oxidation of adrenaline by catalytic substances in the plasma occurs chiefly with formation of adrenochrome, which is next transformed into melanin more or less rapidly, depending on the pH of the medium. In

an acid medium the adrenochrome is stabilized. Monoaminoxidase activity was very slight, lying within the limits of error of the method. It seems that monoaminoxidase in human plasma does not play an important part in the inactivation of adrenaline.

PIŚMIENNICTWO

1. *Ammon R., Dirscherl W.*: Fermente Hormone Vitamine. G. Thieme. Leipzig 1948, str. 225.
2. *Baldwin E.*: Biochemia dynamiczna. Państw. Wyd. Roln. i Leśne. Warszawa 1959.
3. *Bladergroen W.*: Einführung in die Energetik und Kinetik biologischer Vorgänge. Wepf et Co. Verlag. Basel 1955.
4. *Goodall Mc C.*: Pharmacol. Rev. 1959, 11, 317.
5. *Holtz P., Osswald W., Stoch K.*: Arch. Exp. Path. Pharmak. 1960, 1, 239.
6. *Holtz P.*: Pharmacol. Rev. 1959, 11, 317.
7. *Houchin O. B.*: J. Clin. Chem. 1958, 4, 519.
8. *Humoller F. L., Majka F. A., Barah A. J., Stevens J. D., Holthaus J. M.*: J. Clin. Chem. 1958, 1, 4.
9. *Jisalo E., Pekkarinen A.*: Acta Pharmacol. et toxicol., 1958, 15, 157.
10. *Kościelak J., Murawski K., Nieborój-Debosz J.*: Acta Physiol. Pol., 1959, 10.
11. *Leach E. B., Heath R. G.*: A. M. A. Archiv. of Neurol. a. Psych., 1956, 76, 444.
12. *Leuthardt F.*: Lehrbuch der Physiologischen Chemie. Walter de Gruyter & Co. Berlin 1959.
13. *Muralt A. V.*: Einführung in die praktische Physiologie. Springer Verlag. Berlin 1943.
14. *Nakajima H.*: L'Encephale, 1959, 4, 313.
15. *Ravin H. A.*: Lancet, 1956, 1, 1726.
16. *Richterich R.*: Enzymopathologie. Springer Verlag. Berlin. Gottingen-Heidelberg 1958.
17. *Wald J., Murawski K., Szajbel W.*: Postępy Hig. i Med. Dośw., 1959, 13, 697.
18. *Zeller E. A.*: Pharmacol. Rev., 1959, 11, 317.

Otrzymano: 19. 12. 1960.

Adres autorów: Zakład Patologii Og. i Dośw. A. M., Lublin, ul. Staszica 4, Instytut Medycyny Pracy i Higieny Wsi w Lublinie, ul. Czwartek 4a.