

**MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS**

**A SZÉRUM KATALÁZ ÉS A VÉR KATALÁZ CSÖKKENÉS  
VELESZÜLETETT ÉS SZERZETT FORMÁINAK  
PATOBIOKÉMIAI ÉS GENETIKAI VIZSGÁLATA  
MAGYARORSZÁGON**

**GÓTH LÁSZLÓ**



**DEBRECENI EGYETEM**

**ORVOS- ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM**

**ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR**

**KLINIKAI BOKÉMIAI ÉS MOLEKULÁRIS PATOLÓGIAI INTÉZET**

**EGÉSZSÉGÜGYI FŐISKOLAI KAR**

**KLINIKAI KÉMIAI ANALITIKAI TANSZÉK**

**DEBRECEN 2006**

## TARTALOMJEGYZÉK

<b>ELŐZMÉNYEK</b> .....	<b>6</b>
<b>1. BEVEZETÉS</b> .....	<b>10</b>
<b>2. IRODALMI ÖSSZEFOGLALÓ</b> .....	<b>13</b>
2. 1. A HIDROGÉNPEROXID METABOLIZMUS .....	13
.....	
2. 1. 1. Hidrogénperoxid a humán szervezetben .....	13
.....	
2. 1. 2. A hidrogénperoxid termelő és fogyasztó folyamatok .....	15
2. 1. 3. A fiziológias koncentrációjú hidrogénperoxid.....	17
2. 2. A KATALÁZ ENZIM .....	19
2. 2. 1. A hidrogénperoxid metabolizmust szabályozó kataláz enzim működési mechanizmusa és fehérjeszerkezete.....	19
2. 2. 2. A kataláz enzim szintézise .....	31
2. 2. 2. 1. A máj kataláz aktivitásának csökkenése tumoros elváltozásokban ....	31
2. 2. 2. 2. A kataláz szintézis genetikája .....	32
2. 2. 2. 3. A kataláz gén.....	34
2. 2. 3. A kataláz gén polimorfizmusai különböző megbetegedésekben.....	38
2. 2. 3. 1. Kataláz gén mutációk és a diabetes mellitus.....	39
2. 2. 3. 2. Kataláz gén mutációk és a magas vérnyomás .....	39
2. 2. 3. 3. Kataláz gén mutációk és a vitiligo .....	40
2. 2. 3. 4. Kataláz gén mutációk és az Alzheimer kór.....	40
2. 2. 3. 5. Kataláz gén mutációk és a tumorok .....	40
2. 2. 4. Az akatalazémia .....	42
2. 2. 4. 1. A veleszületett katalázhiány klinikai tünetei (Takahara?) .....	43
2. 2. 4. 2. Az akatalazémia biokémiai és genetikai jellemzése .....	45
2. 2. 5. Kataláz enzim vizsgálatok a diagnosztikában.....	47
2. 2. 5. 1. Szérum kataláz .....	47
2. 2. 5. 2. Korábbi szérum kataláz vizsgálataim .....	48
2. 2. 5. 3. Vér kataláz.....	49
2.2. 6. Kataláz aktivitás meghatározási módszerek.....	51
2. 2. 6. 1. Kataláz aktivitás meghatározás a keletkező oxigén mérésével.....	51
2. 2. 6. 2. Kataláz aktivitás meghatározás a hidrogénperoxid mérésével .....	52
2. 2. 6. 2. 1. Titrimetriás eljárások.....	52
2. 2. 6. 2. 2. Műszeres eljárások .....	53
2. 2. 6. 2. 3. Kataláz aktivitás mérési módszereim.....	55
<b>3. CÉLKITŰZÉSEK</b> .....	<b>59</b>

<b>4. MÓDSZEREK ÉS BETEGEK</b> .....	61
4. 1. KLINIKAI KÉMIAI MÓDSZEREK .....	61
4. 2. HEMOSZTAZEOLÓGIAI MÓDSZEREK.....	64
4. 3. HEMATOLÓGIAI MÓDSZEREK.....	64
4. 4. KATALÁZ VIZSGÁLATI MÓDSZEREK.....	64
4. 5. MOLEKULÁRIS BIOLÓGIAI MÓDSZEREK.....	69
4. 6. SZÁMÍTÁSI MÓDSZEREK.....	71
4. 7. BETEGEK .....	73
<b>5. VIZSGÁLATI EREDMÉNYEK</b> .....	75
5.1. A SZÉRUM KATALÁZ.....	75
5.1.1. A H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> féllépcső potenciál változása szérum matrix esetén .....	75
5.1.2. A szérum kataláz változása további betegségekben .....	75
5.1.2.1. Szérum kataláz aktivitás növekedés hemolítikus folyamatokban.....	75
5.1.2.2. A szérum kataláz aktivitás változása máj betegségekben.....	76
5.1.2.3. ROC analízis acute pancreatitisben.....	78
5.1.2. 4. A szérum kataláz patológiás gyakorisága .....	78
5.1.3. A szérum kataláz mérés diagnosztikai hatékonyságának növelése .....	79
5.1.3.1. Szubsztrát, pH, hőmérséklet függése .....	80
5.1.3.2. A szérum kataláz izoenzimeit/izozimái .....	81
5.1.3.3. A szérum kataláz differenciál diagnosztikai algoritmus .....	85
5.1.4. A szérum kataláz szervi eredetének vizsgálata.....	86
5.1.4.1. A szérum kataláz szervi eredetének vizsgálata kontroll egyéneknél ....	86
5.1.4.2. A szérum kataláz eredete patológiás folyamatokban.....	87
5.1.4.2.1. Fokozott erythropoesis.....	87
5.1.4.2.2. Tranzienst folyamatok.....	89
5.1.5. Spektrofotometriás kataláz meghatározási módszer kidolgozása.....	90
5.1.6. A szérum kataláz referens tartománya.....	92
5.2. A VÖRÖSVÉRTEST KATALÁZ.....	94
5.2.1. A vérsejtek kataláz tartalma.....	94
5.2.2. A vér kataláz meghatározási módszere.....	95
5.2.3. A vér kataláz referens tartománya.....	96
5.2.4. A vér kataláz aktivitás különböző megbetegedésekben.....	99
5.2.4.1. Anemiák .....	99
5.2.4.2. Tumorok .....	99
5.2.4.3. Atherosclerosis .....	100
5.2.4.4. Schizophrenia .....	100
5.2.4.5. Diabetes mellitus .....	100
5.2.4.6. Vitiligo.....	103
5.2.5 A humán vörösvértest kataláz tisztítása .....	104

5.3. A MAGYARORSZÁGI AKATALAZÉMIA.....	109
5.3.1. A Magyarországi akatalazémia/hypokatalazémia felfedezése.....	109
5.3.2. Az öröklődő kataláz hiány klinikai jellemzői .....	112
5.3.2.1. A nemek aránya.....	112
5.3.2.2. A veleszületett kataláz hiány földrajzi lokalizációja.....	112
5.3.2.3. A veleszületett kataláz hiány gyakorisága Magyarországon .....	112
5.3.2.4. A veleszületett kataláz hiányos egyének betegségei és életkora.....	113
5.3.2.5. A kataláz hiány és a diabetes mellitus.....	113
5.3.3. Az öröklődő kataláz hiány biokémiai jellemzői .....	114
5.3.3.1. A hidrogénperoxid metabolizmus további enzimei... ..	114
5.3.3.2. A szénhidrát és lipid metabolizmus paraméterei.....	115
5.3.3.3. A lipid peroxidáció és a karbonil képződés.....	116
5.3.3.4. A kataláz protein és szöveti kataláz aktivitás.....	117
5.3.3.5. A katalázhiány és a krónikus hemolízis.....	119
5.3.3.6. A kataláz hiány és a homocisztein-, vörösvértest metabolizmus.....	120
5.3.3.7. A kataláz hiány és a HLA-DRB allél típusok .....	121
5.3.4. Az öröklődő kataláz hiány genetikai jellemzői.....	122
5.3.4.1. A molekuláris genetikai vizsgálati stratégia.....	123
5.3.4.2. A Japán és a Magyar akatalazémia molekuláris genetikai összehasonlítása.....	123
5.3.4.3. Benignus kataláz polimorfizmusok Magyarországon.....	125
5.3.4.4. A Magyarországi akatalazémia genetikai típusai .....	127
5.3.4.4.1. A Magyarországi akatalazémia A típusa .....	127
5.3.4.4.2. A Magyarországi akatalazémia B típusa.....	130
5.3.4.4.3. A Magyarországi akatalazémia C típusa .....	132
5.3.4.4.4. A Magyarországi akatalazémia D típusa.....	136
5.3.4.4.5. A Magyarországi akatalazémia E típusa.....	138
<b>6. A VIZSGÁLATI EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE.....</b>	<b>143</b>
6.1. A SZÉRUM KATALÁZ.....	143
6.1.1. A H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> féllépcső potenciál változása szérum matrix esetén .....	143
6.1.2. A szérum kataláz változása további betegségekben.....	143
6.1.2.1. Szérum kataláz aktivitás növekedés hemolitikus folyamatokban.....	143
6.1.2.2. A szérum kataláz aktivitás változása máj betegségekben.....	144
6.1.2.3. ROC analízis acute pancreatitisben.....	144
6.1.2. 4. A szérum kataláz patológiás gyakorisága... ..	145
6.1.3. A szérum kataláz mérés diagnosztikai hatékonyságának növelése .....	145
6.1.3.1. Szubsztrát, pH, hőmérséklet függés .....	145
6.1.3.2. A szérum kataláz izoenzimeit/izoformái.....	146
6.1.3.3. A szérum kataláz differenciál diagnosztikai algoritmus.....	147
6.1.4. A szérum kataláz szervi eredetének vizsgálata.....	147
6.1.4.1. A szérum kataláz szervi eredetének vizsgálata kontroll egyéneknél .	147

6.1.4.2. A szérumb kataláz eredete patológiás folyamatokban .....	148
6.1.4.2.1. Fokozott erythropoesis .....	148
6.1.4.2.2. Tranziens folyamatok .....	148
6.1.4.2.3. A szérumb kataláz eredetére vonatkozó eredményeim összefoglalása .....	150
6.1.5. Spektrofotometriás kataláz meghatározási módszer kidolgozása .....	150
6.1.6. A szérumb kataláz referens tartománya .....	152
6.1.7. A szérumb kataláz aktivitás mérés jelentősége .....	153
6.2. VÖRÖSVÉRTEST KATALÁZ .....	156
6.2.1. A vérsejtek kataláz tartalma .....	156
6.2.2. A vér kataláz meghatározási módszere .....	157
6.2.3. A vér kataláz referens tartománya .....	157
6.2.4. A vér kataláz aktivitás különböző megbetegedésekben .....	159
6.2.4.1. Anemiák .....	160
6.2.4.2. Tumorok .....	160
6.2.4.3. Atherosclerosis .....	160
6.2.4.4. Schizophrenia .....	160
6.2.4.5. Diabetes mellitus .....	160
6.2.4.6. Vitiligo .....	162
6.2.5. A humán vörösvértest kataláz tisztítása .....	162
6.3. A MAGYARORSZÁGI AKATALAZÉMIA .....	164
6.3.1. A Magyarországi akatalazémia/hypokatalazémia felfedezése .....	164
6.3.2. Az örklödö kataláz hiány klinikai jellemzöi .....	165
6.3.2.1. A nemek aránya .....	165
6.3.2.2. A veleszületett kataláz hiány földrajzi lokalizációja .....	165
6.3.2.3. A veleszületett kataláz hiány gyakorisága Magyarországon .....	165
6.3.2.4. A veleszületett kataláz hiányos egyének betegségei és életkora .....	166
6.3.2.5. A kataláz hiány és a diabetes mellitus .....	167
6.3.3. Az örklödö kataláz hiány biokémiai jellemzöi .....	168
6.3.3.1. A hidrogénperoxid metabolizmus további enzimeit .....	169
6.3.3.2. A szénhidrát és lipid metabolizmus paramétereit .....	169
6.3.3.3. A lipid peroxidáció és a karbonil képzödés .....	170
6.3.3.4. A kataláz protein és szöveti kataláz aktivitás .....	170
6.3.3.5. A kataláz hiány és krónikus hemolízis .....	171
6.3.3.6. A kataláz hiány és a homocisztein-, vörösvértest metabolizmus .....	171
6.3.3.7. A kataláz hiány és a HLA-DRB allél típusok .....	172
6.3.3.8. A klinikai és biokémiai eltérések összefoglalása Magyarországi akatalazémiában .....	173
6.3.4. Az örklödö kataláz hiány genetikai jellemzöi .....	174
6.3.4.1. A molekuláris genetikai vizsgálati stratégia .....	174
6.3.4.2. A Japán és a Magyar akatalazémia molekuláris genetikai összehasonlítása .....	174
6.3.4.3. Benignus kataláz polimorfizmusok Magyarországon .....	175

6.3.4.4. A Magyarországi akatalazémia genetikai típusai.....	175
6.3.4.4.1. A Magyarországi akatalazémia A típusa.....	176
6.3.4.4.2. A Magyarországi akatalazémia B típusa.....	176
6.3.4.4.3. A Magyarországi akatalazémia C típusa.....	177
6.3.4.4.4. A Magyarországi akatalazémia D típusa .....	177
6.3.4.4.5. A Magyarországi akatalazémia E típusa.....	178
6.3.4.4.6. A veleszületett kataláz hiányért felelős gén mutációk összefoglalása .....	178
6.3.4.4.7. Az akatalazémia értékelése .....	179
<b>6.4. TECHNIKAI ÚJÍTÁSOK .....</b>	<b>186</b>
6.4.1. Kataláz izoforma kimutatási eljárás .....	186
6.4.2. A szérumban kataláz diagnosztikai értékelését segítő algoritmus.....	186
6.4.2. Spektrofotometriás szérumban kataláz meghatározás .....	186
6.4.3. Mutáció szűrési eljárás A .....	186
6.4.4. Mutáció szűrési eljárás B .....	187
<b>7. A LEGFONTOSABB ÚJ EREDMÉNYEIM .....</b>	<b>188</b>
<b>8. KÖZLEMÉNYEIM.....</b>	<b>189</b>
8.1. A KANDIDÁTUSI FOKOZAT MEGSZERZÉSE ELŐTTI KÖZLEMÉNYEK.....	189
8.2. AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK .....	190
8.3. A KANDIDÁTUSI ÉRTEKEZÉST KÖVETŐ EGYÉB KÖZLEMÉNYEK .....	196
8.4. KÖNYVFEJEZETEK, JEGYZETEK.....	197
<b>9. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS .....</b>	<b>198</b>
<b>10. AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK MÁSOLATAI .....</b>	<b>199</b>

# ELŐZMÉNYEK

A mindenki által jól ismert hidrogénperoxidot Thenard és Gay-Lussac állította elő, és Thenard írta le 1819-ben, hogy bizonyos növényi és állati szövetek ezt oxigén fejlődés közben bontják.

Ezért a reakcióért felelős anyagot 1901-ben Loew kataláznak nevezte el feltehetően utalva a katalízis jelenségére.

Az 1800-as évek végére a kataláizról már sok információ vált ismertté, mivel rendkívül nagyszámú szubsztrátot képes rövid idő alatt átalakítani, nagy koncentrációban található a növényi, állati és emberi szövetekben, valamint aktivitása az egyszerű térfogatméréssel megvalósítható.

Az 1900-as évek kezdetén és első felében kataláz bevonult a diagnosztikába is. Az anémia diagnózis a vér kataláz mérése révén, míg az akut pancreatitis, és a hemolitikus folyamatoké a szérum kataláz aktivitás segítségével.

A tudományos kutatásban a máj csökkent kataláz aktivitása tumoros folyamatokban ezen időben sokak által művelt kutatási terület volt. A jelenség pathomechanizmusának vizsgálata még napjainkban is aktuális téma.

Az enzimatis reakciók mechanizmusa tanulmányozásához is a kataláz szolgált korai példaként.

A veleszületett humán enzim hiányok között is az egyik első volt 1948-ban a kataláz hiány.

A klinikai enzim diagnosztika azon korai korszakában (1950-es évek), amikor kevésszámú, kizárólagosan manuális módszereket és többfajta analitikai eljárást alkalmaztak a klinikai kémiai laboratóriumok a szérum kataláz meghatározás ígéretesnek tűnt.

A klinikai rutin laboratóriumban dolgozó, analitikai szemléletű, kezdő diplomásként megragadott az enzimek azon tulajdonsága, hogy szelektíven csak egy vagy néhány vegyület reakcióját katalizálják nagy sebességgel. Ez annyira megragadott, hogy eldöntöttem a klinikai enzimdiagnosztikával fogok részletesebben foglalkozni. Ez az időszak egyben az enzimdiagnosztika kezdeti, nagy reményekkel kecsegtető korszaka is volt.

A következő kérdés az volt, hogy melyik legyen a kiválasztott enzim?

A már részletesen vizsgált GOT, GPT, alkalikus foszfatáz, amiláz vizsgálatokon túlmenően egy régről ismert, de kissé elfelejtett enzim, a kataláz keltette fel az én, és munkahelyi vezetőm dr. Mészáros István igazgató-főorvos figyelmét. A következő lépés a meghatározási eljárás kidolgozása volt. Ehhez egy specifikus, olcsó hidrogénperoxid mérési eljárásra volt szükség. Ekkor gondoltunk a polarográfra, amely ezen követelményeket kielégítette.

A polarográfias szérum kataláz meghatározás képezte egyetemi doktori értekezésem, és számos alkalmazása a különböző megbetegedésekben a klinikus kollégákkal történő kooperáció eredménye.

A kataláz aktivitás meghatározási módszeremet a tudomány és a lehetőségek fejlődésével állandóan továbbfejlesztettem.

A meghatározási módszer birtokában vizsgáltam a szérumban kataláz aktivitást különböző megbetegedésekben, és ezeket az 1970 és 1984 közötti eredményeket a kandidátusi értekezésemben foglaltam össze.

1994-ben amikor, a Debreceni Orvostudományi Egyetem Prof. Muszbek László akadémikus által vezetett Klinikai Kémiai Intézetbe nyertem kinevezést, a kataláz enzim vizsgálatát tovább folytathattam, új megfelelőbb lehetőségek között.

A kataláz enzimmel történő vizsgálódásaim során annyi érdekes, új jelenséggel, megválaszolandó kérdéssel találkoztam, és találkozom ma is, hogy még 2005-ben is ez a fő kutatási területem.

Kandidátusi értekezésem utáni időszakban az enzim diagnosztika kevésbé művelt két területével kezdtem foglalkozni.

a. Először azt próbáltam eldönteni, hogy az egyes megbetegedésekben talált kataláz emelkedés melyik szervből kerülhet a szérumba jelezvén annak károsodását.

b. Másodszor a több megbetegedésben is mérhető, jelentős szérumban kataláz növekedés diagnosztikai specificitását próbáltam növelni az 1980-as években elérhető, újnak számító eljárásokkal.

Később a spektrofotometriás kataláz aktivitás meghatározási módszert dolgoztam ki, amelyet ma több országban alkalmaznak. Ennek alkalmazásával a szérumban vizsgálata után a vörösvértest kataláz aktivitását tanulmányoztam különböző megbetegedésekben illetve kóros állapotokban.

A 1989-ben a világ több országában már detektált veleszületett kataláz hiány vizsgálatát tűztem ki célként, és kezdtem vizsgálni. Ennek eredménye a Magyarországon és elsőként talált kataláz hiányos egyének. A veleszületett kataláz hiány Magyarországi formáját jellemeztem klinikai, klinikai kémiai és molekuláris genetikai vizsgálatokkal. Ezzel utalva arra, hogy a modern orvostudomány a rendszerbiológián alapulva nem nélkülözheti a klinikai, laboratóriumi, és genomikai markerek vizsgálatát, ismeretét.

Munkám során tapasztaltam, hogy erről a régóta ismert enzimről alkotott ismereteink a tudomány, a technika fejlődése révén állandóan változnak, és állandóan nő azon korábban leíró jelleggel megismert folyamatoknak száma, amelyeknek ma már evidens és plauzibilis magyarázatát tudjuk adni.

Ez a fejlődés különösen jelentős a kataláz szubsztrátja a hidrogénperoxid szerepének megítélésében, amelyről ma már ismert, hogy nemcsak toxikus melléktermék, hanem bizonyos esetekben és alacsony koncentrációban fiziológiás folyamatokban játszik szerepet.

A kataláz enzim és hidrogénperoxid közötti reakció nem vált volna ismertté, ha a legújabb komputeres kémia nem segített volna a folyamat megismerésében.



A tumorokban korábbról ismert kataláz csökkenés a molekuláris genetika eredményeivel ma már egyértelműen a szintézisének csökkenésére vezethető vissza.

A veleszületett kataláz hiány egyes formáinak pontos leírásához napjainkban már elengedhetetlen a genotípustól a fenotípusig vezető hatásmechanizmus részletes ismerete.

A katalázról illetve ennek veleszületett hiányával foglalkozó kiváló tudósok (Takahara S. Japánban illetve Aebi H. Svájcban) életkora illetve korai halála miatt a veleszületett kataláz hiánnyal kapcsolatos közlemények az 1970-as évek közepétől csak szórványosak és nem ölelik fel a kérdés teljes (klinikai, biokémiai, genetikai) vertikumát.

A kataláz enzimről magyar nyelvű összefoglaló még nem jelent meg, és az utolsó angol nyelvű könyv fejezet is 1995-ben (Eaton JW, Mu M. Acatlasemia) került kiadásra.

Ezek a tények indokolták téma válsztásomat, hogy a régről ismert kataláz enzim új szerepét/arculatát mutassam be.

A célkitűzések részben foglaltam össze munkám fő céljait.

Az irodalmi részében katalázról a változásokat, az új tendenciákat foglaltam össze és kritikailag értékeltem. Enek eredményeként új megvilágításban mutatom be a hidrogénperoxid metabolizmust, és kapcsolatát a kataláz enzimel.

Munkám során arra is tekintettel voltam, hogy a katalázról különösen annak fiziológiás szerepéről, a hidrogénperoxid metabolizmussal való kapcsolatáról (a hidrogénperoxid metabolizmus fő szabályozó enzime) szóló korszerű ismeretek váltsák fel a korábbi hiányos vagy nem teljesen bizonyított elképzeléseket.

A módszerek és a betegek fejezetben az értekezésben alkalmazott eljárásokat, vizsgálati módszereket módszer csoportonként, és abc sorrendben jelenítettem meg. A vizsgálatokba szereplő egyének jellemzését, válogatási szempontjait szintén ez a fejezet tartalmazza.

A kísérleti részben az általam végzett katalázról kapcsolatos eredményeket foglaltam össze és mutatom be különböző módszerekkel. A szérumban kataláz, a vörösvértest kataláz, és a veleszületett kataláz hiány vizsgálata képezik ezen fejezet főbb részeit.

Az eredmények értékelésének szempontjai a következők.

Először az új eredmények értékelése végeztem az aktuális irodalmi adatok függvényében.

Az eredmények szérumban kataláz kismértékű diagnosztikai jelentősége mellett a szérumban kataláz szerveredete és izoformáinak kimutatása területén hiánypótlóak.

A vér kataláz csökkenést, amelyet több betegségben detektáltunk a genetikai okok hiányában a csökkent képződésnek tulajdonítjuk.

A veleszületett kataláz hiány egy új formájának ismertetése, amit Magyarországon elsőként detektáltam, hazai és nemzetközi viszonylatban is

újszerű eredményeket tartalmaz. Az akatalazémiát korábban tünetmentes, enzim hiánynak tartották. Az általam végzett részletes klinikai, klinikai kémiai és genetikai jellemzés/tünetei/elváltozásai alapján tünetegyüttesnek(szindrómának) is nevezhetjük. A témával kapcsolatos közleményeim a kataláz hiány jelenlegi, nemzetközi irodalmának jelentős részét képezik.

Másodszor a korábbi munkáim értékelését mai ismereteink alapján is elvégzem. Ezen értékelés során több esetben tapasztaltam, hogy az akkori leíró jellegű eredménynek a mai ismereteink alapján már evidens magyarázata adható, mint ezt a következő példa szemléltetheti. Az acute pancreatitisben kimutattuk, hogy a vörösvértestekből, azok lokális hemolízise során felszabadul a kataláz. Ez a láncreakció egy közbülső elemének, a hidrogénperoxidnak csökkentésével a további szabadgyökös folyamatok iniciálását akadályozhatja meg. Ezt támasztja alá, hogy terápiás céllal bejutatott kataláz enzim az ilyen folyamatokban jelentősen csökkentette a komplikációkat.

A munkámhoz jelentős segítséget kaptam klinikus kollégáimtól, munkahelyi vezetőimtől, több közlemény nemzetközi kooperációban valósult meg, és több kutatási pályázat nyújtott pénzügyi lehetőséget. Ezeknek a kollégáknak és szervezeteknek ezúton mondok köszönetet.

A munkámban a betegségek neveinek írásánál az Orvosi helyesírási szótár (Akadémiai Kiadó 1992) volt segítségemre, míg a vegyületek írásánál a kémiai elnevezéseket használtam.

Az értekezésben felhasznált nagyon sok irodalmi hivatkozás között az eligazodást könnyíti, hogy az egyes részek után adtam meg az irodalmi hivatkozásokat, az értekezést megalapozó közleményeket a 8. fejezetnek megfelelő sorrendben is feltüntettem kövér, dőlt, aláhúzott számokkal. Ezekről a módosításokról remélem az értekezés könnyebb olvasását és az alapjául szolgáló közlemények kiemelését.

A kataláz enzim régi és új arculatának ily módon történő bemutatásával ezen enzimen túlmenően egy kissé a klinikai enzimológia változását, fejlődését is szerettem volna bemutatni.

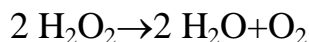
További nem titkolt célom volt, hogy a katalázzal kapcsolatos kutatási eredmények ismertetésével a kutatási témának további hazai kutatókat is megnyerjek tevékenységem bemutatásával. Kihangsúlyozva, hogy a klinikai laboratóriumokban dolgozó kollégáknak is lehetőség kínálkozik arra, hogy hazai és nemzetközi szintű tudományos eredményeket érjenek el különösen akkor, ha ezt kooperációban tudják megvalósítani a klinikus és az elméleti szakemberek együttműködésével.

Debrecen 2006. február

Dr. Góth László

# 1. BEVEZETÉS

## A kataláz enzim (EC 1.11.1.6) a következő reakciót katalizálja



Az enzim szubsztrátját, a hidrogénperoxidot 1819-ban Thenard és Gay-Lussac már előállította [1].

Ezzel kísérletezve Thenard azt találta, hogy az növényi és állati szövetek a hidrogénperoxidot bontják, miközben gáz (oxigén) buborékok képződnek. Ma már tudjuk, hogy ez a jelenség a szövetekben lévő kataláz enzimnek tulajdonítható. Talán ez az egyik első enzimikus jelenség, amelynek leírása [2] 1819-ben Thenard nevéhez fűződik.

A hidrogénperoxid bontását oxigén keletkezése közben később több más anyagnál is tapasztalták, Schönbein ezt a vérmél [3] 1863-ban, Bergergrün pedig a vörösvértesteknél [4].

A baktériumoknál először Gottstein [5] 1893-ban írta le és ebben az évben Beijernick [6] 1893-ban javasolta a bakteriológiában, mint szűrőtesztet. Ez a teszt ma is használatos a kataláz pozitív és a kataláz negatív baktériumok elkülönítésére. Erre a célra az 1950-es években egy készüléket (Gagnon: CATALASIMETER) is kifejlesztettek. A kataláz próba azon alapul, hogy egyes baktériumok felszínén a humán szervezet által a baktériumok elpusztítására termelt hidrogénperoxid elleni védekezés céljából kataláz enzim található. Ezt a katalázt detektáljuk a hozzáadott hidrogénperoxid segítségével.

A kataláz (catalase) elnevezést először Loew használta 1901-ben [7], és a név azóta is használatos a szakirodalomban.

Az enzim szubsztrátjáról ismert, hogy nagy koncentrációban káros a sejtekre, fehérjékre, DNS-re, de a fodrászatban ('hajszőkítés'), sebészetben már régóta használatos [8], vagyis bizonyos vonatkozásban káros, bizonyos vonatkozásban hasznos anyag.

A kataláz enzim az egyik legnagyobb reakciósebességű enzim. Ezt mutatja, hogy 1 molekula kataláz 1 perc alatt mintegy 1 millió hidrogénperoxid molekulát képes elbontani. Az aktivitását ezért kU (1 000 U), illetve MU (1 000 000 U)-ban szoktuk megadni.

A különböző meghatározási módszereknek tulajdoníthatóan a kataláz enzimnek több egységét is definiálták (Bergmeyer U, katalase Féhigkeít.), amelyek ma már nem használatosak.

A napjainkban használatos kataláz egység a U. 1 U az az enzim mennyiség, amely 1  $\mu\text{mol}$  hidrogénperoxid szubsztrátot 1 perc alatt oxigénné és vízzé alakít, optimális körülmények között. A klinikai kémiában ezt az enzim mennyiséget 1 liter vizsgálati mintára (1 U/l szérum, plazma, vér) vagy 1 g szövetre/hemoglobinra (1 U/g) vonatkoztatjuk.

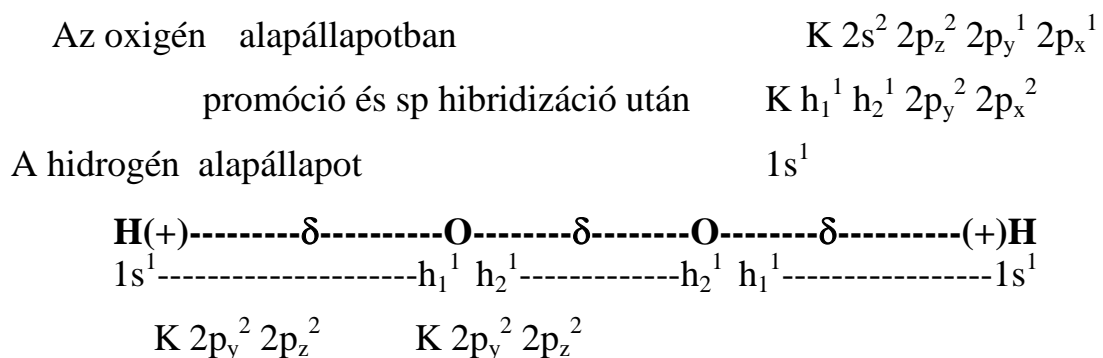
A kataláz enzimmel kapcsolatos vizsgálódásokat és a későbbi kutatásokat lehetővé tette az, hogy szubsztrátja már korábbról ismert, meghatározási módja a reakcióban keletkező oxigén térfogatának mérésével könnyen kivitelezhető, nagy a reakció sebessége és egyes szervekben a citoszol (vörösvértest), peroxiszómák, mitokondriumok (máj, tüdő, vese) nagy koncentrációban tartalmazzák [9]. Az egyes szövetek specifikus kataláz aktivitásainak különbözőségét mutatja a következő táblázat [10].

Az egyes humán szövetek specifikus kataláz aktivitásai

Szövet	Specifikus kataláz aktivitás (U/g szövet)
Teljes vér	$4,67 \pm 0,9 \times 10^5$
Máj	$3,33 \pm 1,5 \times 10^5$
Tüdő	$2,56 \pm 0,54 \times 10^5$
Vese	$1,97 \pm 0,58 \times 10^5$
Pancreas	$0,78 \pm 0,23 \times 10^5$
Szív	$0,72 \pm 0,24 \times 10^5$
Szérum	$0,50 \pm 0,18 \times 10^2$ vagy $50,5 \pm 18,1$ kU/l.

Napjainkban hasonló eredményeket szolgáltatnak a génexpressziós vizsgálatok [11].

**A kataláz szubsztrát hidrogénperoxid molekula elektronhéj konfigurációja**



A H-O kötésben az oxigén a nagyobb elektronegativitása miatt +δ töltés jelentkezik a két hidrogénatomon, valamint H híd kötések is kialakíthatók az oxigén magányos elektronpárja révén. Ez magyarázza a hidrogénperoxid reakcióképességét, illetve instabilitását.

A vízmolekulánál valamivel nagyobb, töltés nélküli molekula meglehetősen könnyen vándorol, diffúzibilis.

A hidrogénperoxid a köztudatban főként oxidatív tulajdonságáról ismert, mivel hatékonyan reagál/oxidálja az oxidációra érzékeny bőr/haj pigmenteket.

## Irodalom

1. Colen NG. Medical chemists and the origins of clinical chemistry in Britain (circa 1750-1850). Clin Chem 2004; 50: 961-972.
2. Thenard LJ. Ann Chim Phys 1819; 11: 85.
3. Schönbein CF. J Pract Chemie 1863; 89: 323.
4. Bergergrün. Inaug Diss Dorpat 1888.
5. Gottstein. Vichow's Arch.f.path Anat 1893; 133: 30.
6. Beijerniick MW. Naturwiss Rundschau 1893; 133: 30.
7. Loew O. US Dept Agr Report 1901; 68: 47.
8. Eaton JW. Hydrogen peroxide a friend of the faux blonde and foe of the cell. Redox Report 1999; 4: 133-4.
9. Góth L. Az enzimdiagnosztika egyik legkorábbi enzime a kataláz. Orvosi Hetilap 1992; 133: 499-500. [L]
10. Góth L. Determination of catalase activity in human tissues by programmable polarograph. Hungarian Scientific Instruments 1982; 53: 43-45.
11. CAT. <http://www.hgmd.org>.

## 2. IRODALMI ÖSSZEFOGLALÓ

### 2. 1. A HIDROGÉNPEROXID METABOLIZMUS

#### 2. 1. 1. Hidrogénperoxid a humán szervezetben

Régóta ismert, hogy a hidrogénperoxid, mint oxidálószer, nagy koncentrációban toxikus a sejtekre, fehérjékre, DNS-re. Ezért az ellene való védekezésre fejleszthette ki a szervezet a kataláz enzimet, amely szinte minden szövetben megtalálható. A kérdés tehát az, hogy ez az enzim és/vagy segítői az összes hidrogénperoxidot eltávolítják, vagy kis koncentrációban azonban megtalálható-e az egyes test folyadékokban a hidrogénperoxid. A kérdés megválaszolását sokáig nehezítette, hogy a kis koncentrációjú hidrogénperoxid meghatározására alkalmas eljárás nem állt rendelkezésre.

Napjainkban a kemilumineszcenciás eljárások, ezek újabb módosításai és a tömegspektrometriás eljárások nemcsak kis koncentrációjú hidrogénperoxidot képesek meghatározni, hanem ennek változásait különböző patológiás állapotokban [1], mint ezt a következő közlemények is szemléltetik.

Frei és mtsai [2] azt találták, hogy a humán plazma hidrogénperoxid koncentrációja nagyobb, mint  $0,25 \mu\text{mol/l}$ , míg a lipid-hidroperoxidoké viszont kevesebb, mint  $0,03 \mu\text{mol/l}$ .

A humán plazmában kontroll egyéneknél (n: 10)  $2,5 \pm 0,07 \mu\text{mol/l}$  hidrogénperoxid koncentrációt, míg különböző tumorokban (n: 23) ennek emelkedését ( $6,2 \pm 0,13 \mu\text{mol/l}$ ) találták, amit az oxidatív stressznek tulajdonítanak. Hasonló emelkedést detektáltak diabetesben ( $6,9 \pm 2,3 \mu\text{mol/l}$ ), ahol a kontrollok hidrogénperoxid koncentrációja  $2,6 \pm 1,5 \mu\text{mol/l}$  volt [3,4].

O'Connor és mtsai [5] kontrolloknál az előbbiekhöz hasonló hidrogénperoxid koncentrációt ( $2,5 \pm 0,16 \mu\text{mol/l}$ ) mértek. Ezt a magas vérnyomásban szenvedőknél talált  $3,16 \pm 0,14 \mu\text{mol/l}$ -el hasonlították össze és az emelkedést szignifikánsnak találták. A magasvérnyomásos családok normotenziós tagjainál is kimutattak emelkedést ( $2,83 \pm 0,27 \mu\text{mol/l}$ ).

A vörösvértestekben a plazmához képest ( $\approx 1 \mu\text{mol/l}$ ) nagyon alacsony a hidrogénperoxid koncentráció ( $2 \times 10^{-4} \mu\text{mol/l}$ ) [6]. Ez a két közegben mért nagyon eltérő (mintegy 2 000-szeres) kataláz enzim aktivitás különbségnek tulajdonítható.

A vizeletben a plazmánál szélesebb határok között változik a hidrogénperoxid koncentráció. Ez Long és mtsai [7] kisszámú vizsgálatai szerint az Egyesült Királyságban  $11-117 \mu\text{mol/l}$  (átlag:  $38,5 \mu\text{mol/l}$ , n: 10) és hasonló ( $5,8-109,6 \mu\text{mol/l}$ , átlag:  $32,1 \mu\text{mol/l}$ , n: 17) volt Singapurban. Hasonló határokról ( $0,4-109,6 \mu\text{mol/l}$ ) és eltérő átlagos ( $16,9 \mu\text{mol/l}$ , n: 16) vizelet

hidrogénperoxid koncentrációk találhatók Haliwell és mtsai [8] egy másik közleményében.

A vizelet hidrogénperoxid koncentrációja hasonlóan a plazmához szintén emelkedik tumorokban, míg a referens egyéneknél  $15,0 \pm 9,8 \mu\text{mol/l}$  (n: 10) mérhető, addig a tumorosoknál jelentős emelkedése ( $56,3 \pm 3,9 \mu\text{mol/l}$ ) volt kimutatható [3].

Érdekes megemlíteni, hogy a referens egyéneknél instant kávé fogyasztása után megemelkedett a vizelet hidrogénperoxid koncentrációja és hasonló hatású volt az instant és zöld tea fogyasztása is [9]. A vizelet hidrogénperoxid koncentrációjának emelkedése szerepet játszhat annak sterilítésében, baktériumölő hatásában. A vizelet hidrogénperoxid koncentrációjának értékelésekor figyelembe kell venni, hogy a bent lévő, főként utólagosan belekerülő kataláz pozitív baktériumok a hidrogénperoxid koncentrációját csökkentik.

A modern analitikai eljárások (kemilumineszcencia, tömegspektrometria) lehetővé tették, hogy a kilégzett levegőben, mint nem invazív mintavétellel, is mérni lehessen a hidrogénperoxid koncentrációt. Baldwin és mtsai, valamint Kietzman és munkatársai [10, 11] ARDS-ben (acute respiratory distress syndrome) találtak szignifikáns emelkedést ( $1,68 \pm 0,35 \mu\text{mol/l}$ ) a kontrollokhöz ( $0,34 \pm 0,08 \mu\text{mol/l}$ ) képest.

Zappacosta és mtsai [12] a dohányosok által kilégzett levegőben talált nagyobb hidrogénperoxid koncentrációt ( $0,1-0,6 \mu\text{mol/l}$ ), mint a nem dohányosokéban ( $<0,05 \mu\text{mol/l}$ ).

Egy korábbi közlemény [13] a patkánymájban  $1 \times 10^{-4} \mu\text{mol/l}$  hidrogénperoxid koncentrációról számol be, amin hasonló nagyságrendű, mint a humán vörösvérteteké.

Az előbbi adatok összefoglalása látható a következő táblázatban.

Hidrogénperoxid koncentrációk ( $\mu\text{mol/l}$ ) humán testnedvekben és változásuk betegségekben

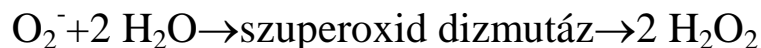
	Referens egyének	Betegségben
Plazma	0,8-6,7	Emelkedik
Vizelet	0,4-117	Emelkedik
Vörösvértet	$2 \times 10^{-4}$	Nincs adat
Kilégzett levegő ( $\mu\text{mol/l}$ )	0,05-0,5	Emelkedik

## 2. 1. 2. A hidrogénperoxid termelő és fogyasztó folyamatok

Az előző adatok demonstrálták, hogy a humán szervek és testnedvek hidrogénperoxidot tartalmaznak, amelynek koncentrációja mérhető. Ebben a

fejezetben a hidrogénperoxidot termelő és fogyasztó fiziológiás, valamint patológiás folyamatokat fogjuk vizsgálni.

A fiziológiás sejtmetabolizmus során is képződnek reaktív oxigén vegyületek. Ezek az oxigén molekula instabil, toxikus és reaktív vegyületei/gyökök, amelyeket a szervezet igyekszik eliminálni. Ezen folyamat során képződik a rendkívül reakcióképes szuperoxid anion ( $O_2^-$ ). Ezt a szervezetben jelen lévő szuperoxid dizmutáz alakítja át a kevésbé agresszív hidrogénperoxidá. [14]



A szervezetben a fehérjék spontán, nem enzimátikus reakciója glükózzal (glikálás), amely a glikált fehérjéket eredményezi, szintén hidrogénperoxid képződéssel járó folyamat [15].

Több gyógyszerről is ismert, hogy hatásuk/eliminációjuk során hidrogénperoxid képződik. Ilyen gyógyszerek a primaquine, pamaquine [16], dopamine [17], phenylhydrazine, menadione [18].

Nemcsak gyógyszerek, hanem egyes élelmiszerek és italok fogyasztása is járhat hidrogénperoxid képződéssel. Ezek közül a divicin tartalmú lóbab (fava bean) [19] és az instant kávé, tea [20] fogyasztása a lehet a leggyakoribb forrása a hidrogénperoxid koncentráció növekedésének.

A különböző tumorok malignus sejtjei is fokozottan produkálják a hidrogénperoxidot [21-23].

Fokozott hidrogénperoxid képződéssel jár a hemoglobin auto-oxidációja [24] és nagy szuperoxid dizmutáz aktivitás esetén időlegesen nagy hidrogénperoxid koncentráció alakulhat ki [25].

További hidrogénperoxid generáló ágens lehet a növekedési faktor [26], a membránhoz kötött  $\gamma$ -GT [27], a glutation oxidációja [28], egyes agyi enzimek [29] (monoamin oxidáz, tirozin hidroxiláz, L-aminosav oxidáz), szemikarbazid-érzékeny amino-oxidáz) [30], ciszteamin [31], inzulin [32, 33], az epidermális növekedési faktor [34], citotoxikus ágensek (6-hidroxi-dopamin, 6-aminodopamin, 6, 7 hidroxitriptamin, a dialur sav) [35] és az LDL [36].

A hidrogénperoxid termelő folyamatok közé tartozik még a fagocitosis során az egyes fehérvérsejtek által a baktériumok megsemmisítésére termelt hidrogénperoxid is.

A hidrogénperoxid termelés sebessége vörösvértetekben Giulivi és mtsai közleménye alapján  $1,36 \pm 0,2 \mu\text{mol}/\text{óra}$  [37].

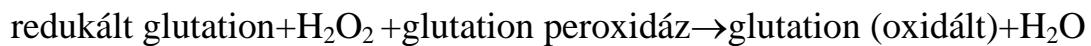
A hidrogénperoxidról ismert azonban, hogy nagy koncentrációban káros a sejtekre [38], ezért a szervezet kifejlesztett különböző védekező mechanizmusokat. Ezekről a védekező mechanizmusokról szerzett ismereteink lényeges változáson mentek át a hidrogénperoxid, illetve a kataláz felfedezése óta.

Thenard [39] az oxidáló hidrogénperoxid csökkentéséért az élő szervezet



egyik anyagát vélte felelősnek, amely a hidrogénperoxidot oxigénfejlődés közben hatástalanítja. Ezt az anyagot később sokfajta élő szervezetében, szervben, szövetben kimutatták és a XX. század fordulóján a kataláz nevet kapta. Az a logikus magyarázat, hogy a kataláz enzim feladata a káros hidrogénperoxid semlegesítése, általánosan elfogadott szempont volt 1850-től egészen az 1960-as évekig [40].

Ezen elmélet egyeduralmát a glutation peroxidáz enzim (enzimatiszus működéséhez szintén hidrogénperoxidot felhasználó enzim) felfedezése [41] kezdte megkérdőjelezni.



A következő években azután már olyan mértékben favorizálták az új glutation peroxidáz enzimet, hogy ezt tartották a hidrogénperoxid elsődleges eltávolítójának [42].

Ez a nézet általánossá vált és a vörösvértetekben nagy koncentrációban lévő, rendkívül aktív kataláz enzimről szinte megfeledkeztek egészen az 1980-as évekig.

A glutation peroxidáz hegemoniájának megtörése hosszú időt és a hidrogénperoxid elimináció folyamatának fokozatos, egyre szélesebb körben történő megismerését igényelte.

Az 1980-as évek második felében kezdődik el a kataláz óvatos rehabilitációja. Agar NS és mtsai [43] már együtt említik a katalázt és a glutation peroxidázt, mint a hidrogénperoxid eltávolítóit a vörösvértetek oxidatív károsodása elleni védelemben.

Gaetani GF és mtsai több egymás utáni közleményében fokozatosan értékelik újra legújabb kísérleti eredményeik alapján a kataláz enzim szerepét.

Az 1989-es közleményükben [44] arról számolnak be, hogy a kataláz enzim eliminálja a hidrogénperoxidnak több, mint felét. Hasonló eredményről, 'a kataláz legalább olyan fontos mint a glutation peroxidáz', számoltak be Scott MD és mtsai [45] is 2 évvel később.

1994 és 1996-ban Gaetani GF és munkacsoportja két további közleményben [46, 47] számol be azon kísérleteiről, amelyek azt mutatják, hogy a kataláz a fő hidrogénperoxid elimináló enzim a vörösvértetekben. Ezt a következő kísérleti eredményekkel támasztják alá: a glutation peroxidáz akkor kezd működni, amikor a kataláznak több, mint 98%-a inaktiválódott, a kataláz a hidrogénperoxidot, míg a glutation peroxidáz főként a szerves peroxidokat eliminálja.

Mueller S és mtsai [48] 1997-ben megerősítik a kataláz domináns szerepét a hidrogénperoxid eltávolításban.

Tehát az 1965 körül kezdődött kataláz trónvesztés gyakorlatilag az 1990-es évek közepéig tartott, mikortól kezdve újra a kataláz a fő hidrogénperoxid eltávolító

enzim. Ebben a folyamatban a glutation peroxidáz is jelen van, de mérsékelt szereppel. Az irodalomban azonban még előfordulnak a glutation peroxidáz fokozott szerepére történő hivatkozások, amelyek korábbi közleményeken alapulnak.

A fenti kísérleti eredmények tehát egyértelműen igazolják a kataláz szerepét a vörösvérttestekben lévő, úgynevezett intracelluláris hidrogénperoxiddal szemben. A hidrogénperoxid azonban nemcsak a nagy kataláz tartalmú vörösvérttestekben képződik, hanem más, kisebb kataláz tartalmú szövetekben is. A hidrogénperoxid kis molekula, valamivel nagyobb, mint a víz, töltéssel nem rendelkezik és ezeknek köszönhetően rendkívül diffúzibilis. Ezek alapján nem meglepő, hogy az újabb irodalmi adatok egyértelműen azt mutatják, hogy a vörösvérttestekben lévő kataláz nemcsak az intracellulárisan, hanem az extracellulárisan képződött és a vörösvérttestekbe, vagy más, nagy kataláz tartalmú sejtekbe diffundált hidrogénperoxid elleni védelmül is szolgál [49-52]. Újabb adatok az eddig ismert két enzimen túlmenően, a hemoglobin gyenge peroxidatikus hatásának is tulajdonítanak hidrogénperoxid eltávolító szerepet. Ennek jelentősége a katalázénál kisebb, de a glutation peroxidázénál nagyobb is lehet [53, 54].

#### Hidrogénperoxid eltávolítási sebességek ( $\mu\text{mol}/\text{sec}/\text{gHb}$ ) humán vörösvérttestekben

Kataláz	30,7 $\pm$ 4,7
Hemoglobin	1,11 $\pm$ 0,12
Glutationperoxidáz	0,24 $\pm$ 0,13

A fenti három folyamat természetesen összhangban, nem egymástól függetlenül zajlik az emberi szervezetben.

### 2. 1. 3. A fiziológiás koncentrációjú hidrogénperoxid

A hidrogénperoxidot termelő különböző folyamatok, a nagy koncentrációjú hidrogénperoxid eliminációja, az egyes humán szervek/szövetek jól detektálható hidrogenperoxid koncentrációi alapján a következő gondolat fogalmazódik meg. Ha a kataláz és az egyéb enzimek nem teljesen távolítják el a hidrogénperoxidot, akkor ennek a sejtekben valamilyen feladata(i) lehet(nek). Melyek lehetnek ezek a feladatok és hogyan maradhat hidrogénperoxid a nagy katalitikus hatékonyságú, nagy koncentrációjú kataláz enzim jelenlétében az egyes sejtekben (vörösvértest, máj)?

Az újabb kutatási eredmények több olyan molekula kis koncentrációjának fiziológiás jelentőségét is bizonyítják, amelyekről korábban egyértelműen azt tartották, hogy toxikusak a humán szervezet számára. Ilyen vegyületek például az egyes reaktív oxigént tartalmazó vegyületek és ezek között is különösen a

hidrogénperoxid. A következő irodalmi adatok alapján a hidrogénperoxid ilyen típusú jelentőségét mutatnám be néhány példával.

A hidrogénperoxid szerepet játszik néhány vegyület, például a hemoglobin [55] vagy mitokondrium mátrix metalloproteázok [56] degradációjában.

A jelátvitelben betöltött szerepét, mint celluláris messenger már 1995-ben Khan és Wilson egy review-ban foglalták össze [57], amit azóta többen is megerősítettek [58, 59]. Az inzulin által mediált jelátvitelben [60-62] is szerepet játszik a hidrogénperoxid, ami részben magyarázhatja a koncentrációját szabályozó kataláz enzim szerepét a diabetes mellitus patomechanizmusában.

A hidrogénperoxid szerepet játszik több intermedier termék aktiválásában, mint például a NF-kappa B transzkripciós factor [63-67], endoteliális NA szintetáz [68], sejt proliferáció [69], vas szabályozó protein (IRP-1) [70], ERK MAP kináz [71], tirozin foszforiláció [72] és fehérje tirozin foszfatáz [73]. Ezen folyamatok során a hidrogénperoxid betölthet aktivációs és inhibíciós funkciót is, sőt akár egész folyamatokra is, mint például a gén transzkripció [74], fejthet ki hatást akár egyedül, akár más antioxidánsokkal közösen.

A hidrogénperoxid részt vehet az apoptózis folyamatában is. A fejezet elején láttuk [55, 56], hogy segítheti egyes anyagok degradációját, de indukálhat apoptózist [75, 76] közvetlenül és közvetve is a kaszpáz aktivitás szabályozása révén [77].

A legújabb ismeretek szerint inzulin hatására a sejtek által termelt ROS (Reactive Oxygen Species), de főként a hidrogénperoxid, mint másodlagos messenger mimikálhatja az inzulin hatását. Ezen utóbbi abban nyilvánul meg, hogy inaktiválja a negatív regulátorként ismét protein tirozin foszfatázok ciszteinjét annak oxidálása révén. Ekkor a protein tirozin foszfatázok nem tudják defoszforilálni az inzulin receptort és annak tirozin foszforilált szubsztrátját.

A ROS másik hatása az, hogy aktiválja a szerin/tirozin kináz kaszkádot, amely az inzulin receptort és az inzulin receptor szubsztrátot foszforilálja.

A magas, hosszú ideig persistáló hidrogénperoxid azonban mindkét folyamatot befolyásolja. Egyrészt károsíthatja az inzulintermelő pancreas sejteket, illetve az az inzulin receptor szubsztráton a szerin fokozott foszforilálása, csökkenti a tirozin foszforilálását és így növeli a molekula degradációját [78, 79].

A fent felsorolt folyamatokban a hidrogénperoxid betölt valamilyen szabályozó szerepet, amihez a sejtekben a jelenléte bizonyos koncentrációban szükséges. Ezeket a folyamatokat az utóbbi 15 évben írták le, mintegy megváltoztatva a hidrogénperoxidról alkotott korábbi szemléletet, amely ezt az anyagot egyértelműen toxikus-káros mellékterméknek minősítette, amelytől a szervezetnek teljes mértékben meg kell szabadulnia [80-82].

Összefoglalva, a hidrogénperoxid nagy koncentrációban toxikus, míg kis koncentrációban fiziológias szereppel rendelkezik. Ezt a jelenséget a legújabb irodalmak hidrogénperoxid/redox paradoxon névvel említik [79].

## 2. 2. A KATALÁZ ENZIM

### 2. 2. 1. A hidrogénperoxid metabolizmust szabályozó kataláz enzim működési mechanizmusa és fehérjeszerkezete

A humán szervezetben a kataláz enzimet tartalmazó szövetekben is van mérhető koncentrációjú hidrogénperoxid, amelynek ott fiziológias jelentősége is van.

A kataláz enzimnek tehát olyan reakciómechanizmussal kell rendelkezni, amely a toxikus, nagy koncentrációjú hidrogénperoxidot nagyon gyorsan inaktíválja, de ugyanakkor a fiziológias koncentrációjának engedi a működését. Ebben a fejezetben ezeket a korábbról ismert kataláz specificitásokat, sajátosságokat teszük plauzibilissé a legújabb irodalmi adatok felhasználásával.

A kataláz reakció mechanizmusának, az enzim-szubsztrát komplex kialakulásának az egyik első, részletesen tanulmányozott példája a kataláz. Chance B. már 1947-ben kimutatta a kataláz-hidrogénperoxid, az enzim szubsztrát komplexet a kataláz működése során [83], majd egy későbbi közleményében összefoglalta a kataláz mechanizmus specialitásait [84], amelyek a következők.

1. A kataláz enzim reakciója a hidrogénperoxiddal nem írható le a többi enzimre alkalmazható Michaelis-Menten kinetikával, illetve bizonyos körülmények között (szérum kataláz) egy szűk koncentráció tartományra érvényes csak [85].
2. A szubsztrát bontása rendkívül gyors, talán az egyik leggyorsabb enzimatis reakció. Egy kataláz molekula egy perc alatt mintegy 1 millió szubsztrát molekulát alakít át/bont el.
3. Az alacsony aktiválási energiának tulajdoníthatóan a reakció hőmérséklet függése egészen kicsi [3].
4. A hidrogénperoxid szubsztrát nagy koncentrációja (50  $\mu\text{mol/l}$  felett) oxidálhatja a proteineket, köztük a saját kataláz fehérjét is. Ezen folyamatban a kataláz tetramer inaktív kataláz monomerekké alakul a H-hidak felszakadása révén. Ugyancsak ekkor történhet az SH csoportok oxidálása S=S hidakká. Ez utóbbi változásnak a kataláz esetében a szokásosnál kisebb, elhanyagolható jelentősége van, mivel ezen csoportok száma nem jelentős és nem is vesznek részt az enzimatis reakcióban.

Ezen túlmenően a nagy szubsztrát koncentráció kedvez az enzim-szubsztrát komplex II kialakulásának, amely enzimatisan inaktív és így nem képződhetnek termékek, nem alakul vissza az aktív kataláz enzim [83, 84].





kötései mintegy kapuként is funkcionálnak (4,8 Å nyílással) és felelősek a kis hidrogénperoxid (3,7 Å széles és rádiusza 2,3 Å) szubsztrát koncentrációjánál mérhető minimális enzim aktivitásért.

Kis hidrogénperoxid koncentrációjánál ez a kapu zárva van és így az enzimaktivitás blokkolódik. Nagy hidrogénperoxid koncentrációjánál a csatornában lévő sok hidrogénperoxid molekula kiszorítja a víz molekulákat, megszünteti a hidrogénhidat és ezáltal teszi szabaddá az utat az aktív centrumhoz, ahol megkezdődhet és folyhat a szubsztrát konverziója.

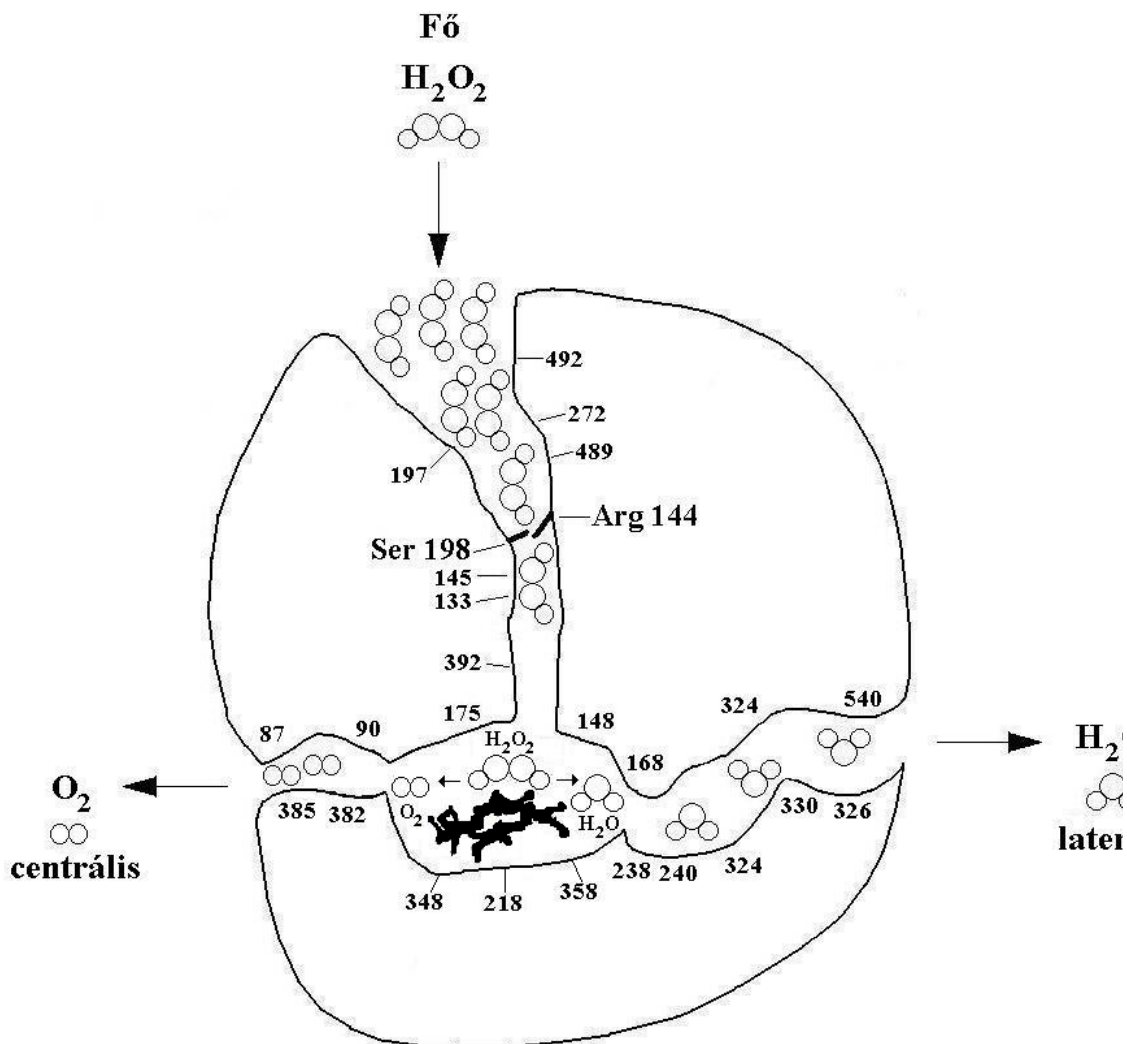
A legújabb kutatási eredményeken alapuló mechanizmus tehát szemlélteti és magyarázza azt a korábban már ismert tényt, hogy kis szubsztrát koncentrációjánál miért nem hatékony a kataláz enzim a szubsztrátjára és így a kis koncentrációjú hidrogénperoxid befolyásolhatja több fiziológiai folyamatot.

A központi (centrális) a csatorna az aktív helytől vezet kifelé és szerepe feltehetően a reakcióban keletkezett oxigénmolekulák kijuttatása az aktív hely környezetéből. A reakciótermék eltávolítása mindig a reakciósebesség növekedését eredményezi.

A laterális csatorna 35 Å hosszú és az aktív helytől az alfa-hélikális doménig vezet. Térfogata alapján 12 víz molekulát tartalmazhat. Feladata a reakcióban keletkezett másik végtermék, a víz eltávolítása a reakcióteréből. A csatorna nyitását feltehetően a keletkezett víz triggeli, aminek révén a víz mintegy kiszívódik a reakcióteréből.

A kataláz enzim rendkívül nagy szubsztrátbontó képességét részben szerkezete is magyarázhatja, mivel lehetővé teszi, hogy egy csatornán a szubsztrát szabadon eljuthasson az aktív centrumig (fő csatorna), másrészt külön csatornát tart fent az enzimikus reakcióban keletkezett oxigén (centrális) és víz (laterális) eltávolítására.

Ezen újabb kutatási eredmények [88-91] plauzibilis magyarázatát adják a már jóval korábban közölt, leíró jellegű kísérleti eredményeknek [83, 86].

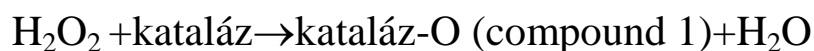


A kataláz fehérje fő csatornája, amely a felszíntől az aktív centrumig vezet, benne a víz molekulák.

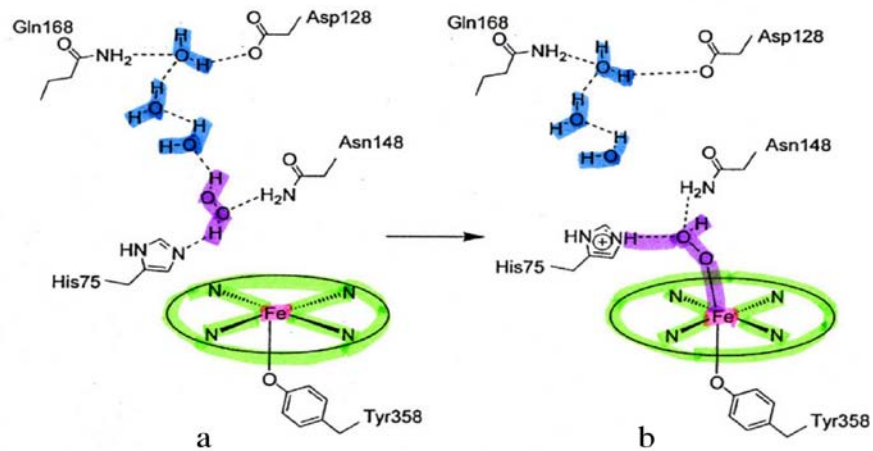
A Ser 198, Arg 144 és víz molekula által képzett H-híd blokkolja az aktív centrumhoz vezető utat kis hidrogénperoxid koncentráció esetén.

Nagy hidrogénperoxid koncentráció esetén a víz molekulák helyett H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> molekulák vannak a csatornában és a kaput záró H-híd nem tud kialakulni.

**Az enzim hidrogénperoxid konverziója során az első lépés:**

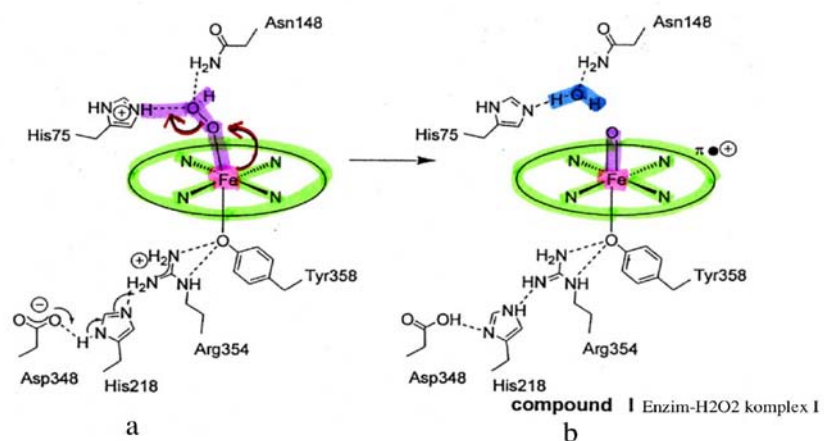


A fő csatorna geometriája által szelektált első hidrogénperoxid molekula az aktív centrumban a Hisztidin75 és Aszparagin148-al H-híd kötést alakít ki. Ezután oxigénjének magányos elektronpárja beépül a vas üres elektronpályájára.



A vas és az első szubsztrát molekula reakciója  
 A következő lépésben az elektronszívó Hisztidin75 és Aszparagin148, valamint az elektron aktív vas révén megváltozik a peroxid kötés elektronellátottsága, ami a kötés heterolitikus felszakadásához vezet, amit a bal oldali ábra mutat.

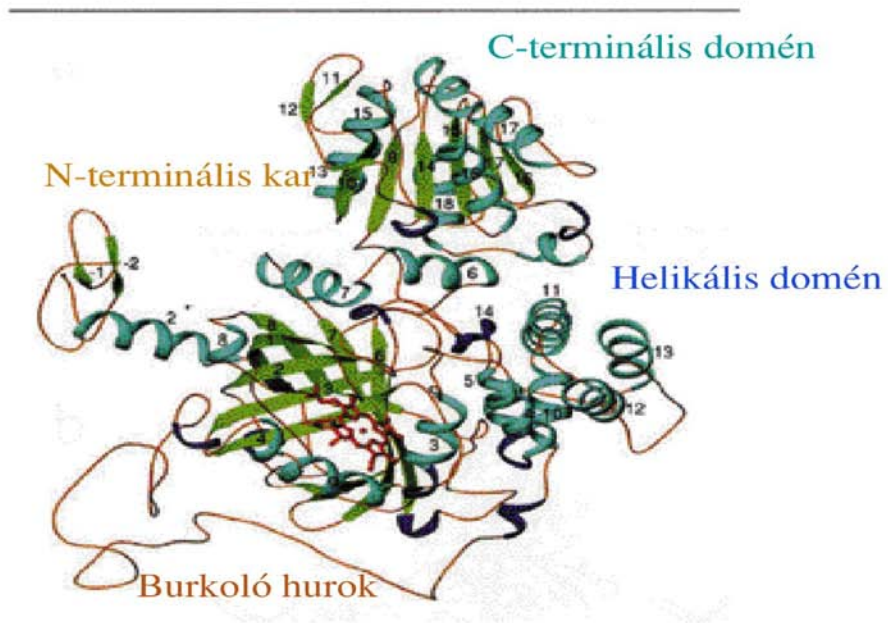
A folyamat eredményeként egy molekula víz és az enzím szubsztrát komplex I (compound I) keletkezik, mint ez a jobb oldali ábrán látható.



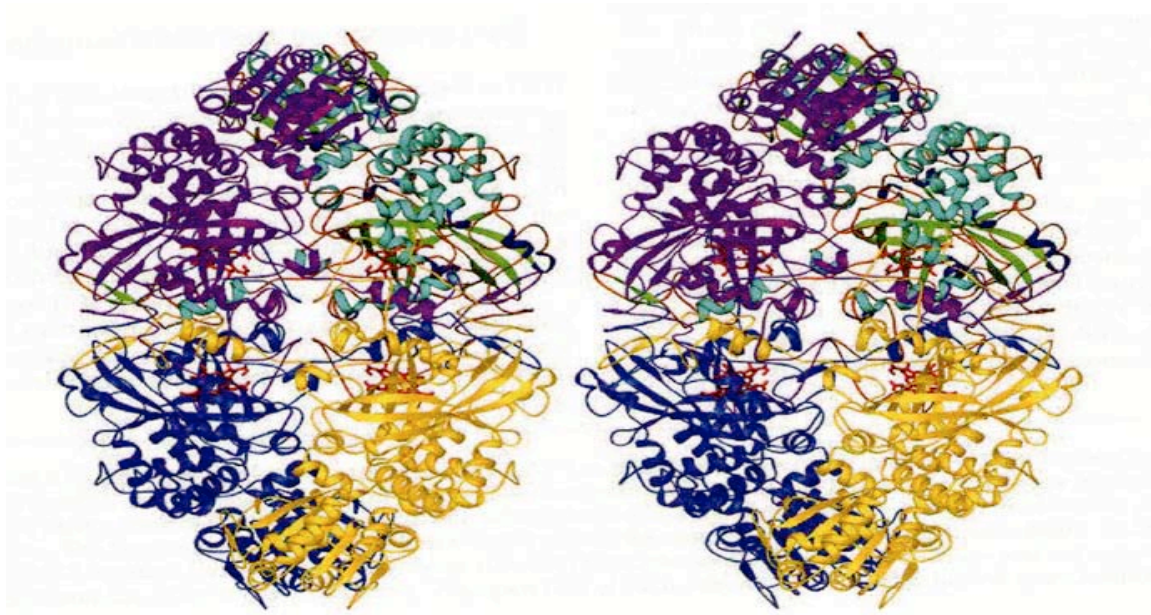
A kataláz és hidrogénperoxid reakciójában kialakuló enzím-szubsztrát komplex I



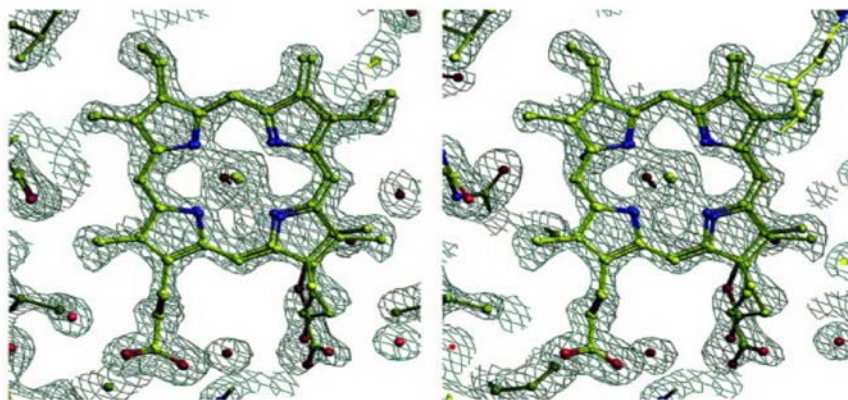




A kataláz alegység (subunit)  
 A burkoló hurok az alegységek közötti kapcsolódást segíti, a hem csoport az alegység belsejében látható.



A négy azonos alegységből álló, végleges, enzimatikusan aktív kataláz tetramer, minden egyes alegységben egy hem csoporttal.



Az enzim aktív része (hem) felülnézetben, a pirrolgyűrű közepén a  $\text{Fe}^{3+}$

Az enzimatikusan aktív kataláz enzim szerkezete és működési mechanizmusa a legújabb irodalmi adatok alapján magyaráz több korábban kísérletesen meghatározott vagy feltételezett tulajdonságot [96].

#### Irodalom

1. Halliwell B, Clement MV, Long LH. Hydrogen peroxide in human body. *FEBS Letts* 2000; 486: 10-13.
2. Frei B, Yamamoto Y, Niclas D, Ames BC. Evaluation of an isoluminol chemiluminescence assay for the detection of hydrogenperoxide in human blood plasma. *Anal Biochem* 1988; 175: 120-130.
3. Banerjee D, Madhusoodanom UK, Nayak S, Jacob J. Urinary hydrogen peroxide: a probable marker of oxidative stress in malignancy. *Clin Chim Acta* 2003; 334: 205-209.
4. Banerjee D, Madhusoodanom UK, Sharana Bapasappa M, Ghosh S, Jacob J. Measurement of plasma hydroperoxide concentration by FOX-1 assay in conjunction with tryphenylphosphine. *Clin Chim Acta* 2003; 337: 147-152.
5. O'Connor LF, Schmid-Schöbein GW. Plasma hydrogen peroxide production in hypertension subjects at genetic risk of hypertension. *J Hypertension* 1998; 16: 291-303.
6. Giulivi C, Hochstein P, Davies KJ. Hydrogen proxide production by rede blood cells. *Free Rad Biol Med* 1994; 16: 123-129.
7. Long LH, Evans PJ, Haliwell B. Hydrogen peroxide in human urine: Implications for antioxidant defense and redox regulation. *Biochem Biophys Res Com* 1999; 262: 605-609.
8. Halliell B, Clement MV, Long LH. Hydrogen peroxide in human body. *FEBS Letts* 2000; 486: 10-13.
9. Long LH, Halliwell B. Coffee drinking increases levels of urinary hydrogen peroxide detected in healthy human volunteers. *Free Rad Res* 2000; 32: 463-467.
10. Baldwin SR, Grum CM, Boxer LA, Ketai LH, Devall LJ. Oxidant activity in expired breath of patients with adult respiratory distress syndrome. *Lancet* 1986; 327: 11-14.

11. Kietzman D, Kahl R, Muller M, Brudardi H, Kettler D. Hydrogen peroxide in the expired breath condensate of patients with acute respiratory failure with ARDS. *Intensive Care Med* 1993; 19: 78-81.
12. Zappacosta B, Persicilli S, Mormile F, Minucci A, Russo A, Giardina B, deSole P. A fast chemiluminescence method for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> measurement in exhaled breath condensate. *Clin Chim Acta* 2001; 310: 187-191.
13. Oshino N, Chance B. The role of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation in perfused rat liver and the reaction of catalase compound I and hydrogen peroxide donors. *Arch Biochem Biophys* 1973; 154: 117-131.
14. Chance B, Sies H, Bovaris A. Hydrogen peroxide metabolism in mammalian organs. *Phys Rev* 1979; 59: 527-605.
15. Jiang ZY, Woolard ACS, Wolf P. Hydrogen peroxide production during experimental protein glycation. *FEBBS Letts* 1990; 268: 69-71.
16. Cohen G, Hochstein P. Primaquine-induced generation of hydrogen peroxide in erythrocytes. *Blood* 1962; 20: 785.
17. Heikkila RE, Cohen G. In vitro generation of hydrogen peroxide from 6-hydroxy dopamine. *Experientia* 1972; 28: 1197-1198.
18. Cohen G, Hochstein P. In vivo generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in mouse erythrocyte by hemolytic agents. *J. Pharmac Exp Ther* 1965; 147: 139-143.
19. Winterbourn CC, Benatti U, De Flora FA. Contribution of superoxide, hydrogen peroxide, and transition metal ions to autooxidation of the favism-inducing pyrimidine aglycone, divicine, and its reaction with hemoglobin. *Biochem Pharmacol.* 1986; 35: 2009-2015.
20. Long LH, Lan ANB, Lan FTY, Halliwell B. Generation of hydrogen peroxide by 'antioxidant' beverages and the effect of milk addition. Is coca the best beverage? *Free Radicals Biol Med* 1999; 31: 67-71.
21. Behl C, Davis JB, Lesley R, Schubert D. Hydrogen peroxide mediates amyloid  $\beta$  protein toxicity. *CELL* 1994; 77: 817-827.
22. Burdon RH. Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation. *Free Radicals Biol Med* 1995; 18: 775-794. Review.
23. Sztrawski TP, Nathan CF. Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer Res* 1991; 51: 794-798.
24. Nagababu EN, Chrest FJ, Rifkind JM. Hydrogen peroxide induced heme degradation in red blood cells: the protective roles of catalase and glutathione peroxidase. *Biochem Biophys Acta* 2003; 1620: 211-217.
25. Wenk J, Brennesen P, Wlaschek M, Poswig A, Briviba K, Oberley TD, Scharfetter-Kochanek. Stable overexpression of manganese superoxide dismutase in mitochondria identifies hydrogen peroxide as a oxidant in the AP-1 mediated induction of matrix degrading metalloproteases-1. *J Biol Chem* 1999; 274: 25869-25876.
26. Bae GU, Seo DW, Kwon HK, Lee HY, Hong S, Lee ZW, Ha KS, Lee HW, Han JW. Hydrogen peroxide activates p70<sup>S6k</sup> signaling pathway. *J Biol Chem* 1999; 274: 32596-32602.
27. Maellaro E, Dominici S, Bello BD, Valentini MA, Pieri L, Perego P, Supino R, Zunino F, Lorenzini E, Paolicchi A, Comporti M, Pompella A. Membrane gamma-glutamyl transpeptidases activity of melanoma cells: effects on cellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production, cell, surface protein thiol oxidation and NF-kappa B activation. *J Cell Science* 2000; 113: 2671-2678.
28. Go YM, Gippi JJ, Mulcahy RT, Jones DP. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dependent activation of GCLC-ARE4 reporter occurs by mitogen-activated protein kinase pathways without or thioredoxin-1. *J Biol Chem* 2004; 279: 5837-5845.

29. Sinet PM, Heikkila RE, Cohen G. Hydrogen peroxide production by rat brain in vivo. *J Neurochem* 1980; 34: 144-148.
30. Mercier N, Moldes M, Hadri E, Feve B. Semicarbazide-sensitive amino oxidase activation promotes adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Biochem J* 2001; 358: 335-342.
31. Jeitner TM, Lawrence DA. Mechanism for cytotoxicity of cysteamine. *Toxicol Sci* 2001; 63: 57-64.
32. Mahadev K, Wu X, Zilbering A, Zhu I, Lawrence TR, Goldstein BJ. Hydrogen peroxide generated during cellular insulin stimulation is integral to activation of the distal insulin signaling cascade in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem*. 2001; 276: 48662-48669.
33. Mahadev K, Motoshima H, Wu X, Ruddy JM, Arnold RS, Cheng G, Lambeth JD, Goldstein BJ. The NAD(P)H oxidase homolog Nox4 modulates insulin stimulated generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and plays an integral role in insulin signal transduction. *Mol Cell Biol* 2004; 24: 1844-1854.
34. Bae YS, Kang SW, Seo MS, Baines IC, Tekle E, Chock PB, Rhee SG. Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide. Role in EGF receptor-mediated tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* 1997; 272: 217-221.
35. Cohen G, Heikkila RE. The generation of hydrogen peroxide, superoxide radical, and hydroxyl radical by 6 hydroxydopamine, dialuric acid, and related cytotoxic agents. *J Biol Chem* 1974; 249: 2447-2452.
36. Guerci B, Antebi H, Meyer L, Durlach V, Ziegler O, Nicolas JP, Alcindor LG, Drouin P. Increased ability of LDL from normolipidemic type 2 diabetic women to generate peroxides. *Clin Chem*. 1999; 45: 1439-1448.
37. Giulivi C, Hochstein P, Davies KJ. Hydrogen peroxide production by red blood cells. *Free Radicals Biol Med*. 1994; 16: 123-129.
38. Eaton JW. Hydrogen peroxide a friend of the faux blonde foe of the cell. *Redox Report* 1999; 4: 133-134. Editorial.
39. Thenard LJ. *Ann Chim Phys* 1819 ;11:85.
40. Jacob HS, Ingbar SH, Jandl HJ. Oxidative hemolysis and erythrocyte metabolism in hereditary acatalasia. *J Clin Invest* 1965; 44: 1187-1198.
41. Mills GC. Hemoglobin catabolism I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *J Biol Chem* 1957; 229: 189-197.
42. Cohen G, Hochstein P. Glutathione peroxidase: The primary agent for the elimination of hydrogen peroxide in erythrocytes. *Biochem J*. 1963; 2: 1420-1428.
43. Agar NS, Sadrzadeh SMH, Hallaway PE, Eaton JW. Erythrocyte catalase. A somatic oxidant defense. *J Clin Invest* 1986; 77: 319-321.
44. Gaetani GF, Galiano S, Canepa L, Ferraris AM, Kirkman HN. Catalase glutathione peroxidase equally active in detoxification of hydrogen peroxide in human erythrocytes. *Blood* 1989; 73: 334-339.
45. Scott MD, Lubin BH, Zuo L, Kuypers FA. Erythrocyte defense against hydrogen peroxide. Preeminent importance of catalase. *J Lab Clin Med* 1991; 117: 7-16.
46. Gaetani GF, Kirkman HN, Mangerini R, Ferraris AM. Importance of catalase in the disposal of hydrogen peroxide within human erythrocytes. *Blood* 1994; 84: 325-330.
47. Gaetani GF, Ferraris AM, Rolfo M, Mangerini R, Arena S, Kirkman HN. Predominant role of catalase in the disposal of hydrogen peroxide within human erythrocytes. *Blood* 1996; 87: 1595-1599.
48. Mueller S, Riedel HD, Stremmel W. Direct evidence for catalase as the predominant H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> removing enzyme in human erythrocytes. *Blood* 1997; 90: 4973-4978.
49. Nagababu E, Christ FJ, Rifkin JM. Hydrogen-peroxide induced heme degradation in red blood cells: protective roles of catalase and hydrogen peroxide *Biochim Biophys Acta* 2003; 1620: 211-217.



50. Makino N, Mochizuki Y, Bannai S, Sugita S, Sugita Y. Kinetic studies on the removal of extracellular hydrogen peroxide by cultured fibroblasts. *J Biol Chem* 1994; 269: 1020-1025.
51. Masuoka N, Wakimoto M, Ubuka T, Nakano T. Spectrophotometric determination of hydrogen peroxide: catalase activity and rates of hydrogen peroxide removal by erythrocytes. *Clin Chim Acta* 1996; 254: 101-112.
52. Hashida K, Sakakura Y, Makino N, Kinetic studies on the hydrogen peroxide elimination by cultured PC12 cells: rate limitation by glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Biochem Biophys Acta* 2002; 1672: 85-90.
53. Wakimoto M, Masuoka N, Nakano T, Ubuka T. Determination of glutathione peroxidase activity and its contribution to hydrogen peroxide removal in erythrocytes. *Acta Med Okayama*. 1998; 52:b233-237.
54. Masuoka N, Kodman H, Abe T, Wang DH, Nakano T. Characterization of hydrogen peroxide removal action by hemoglobin in the presence of reduced pyridine nucleotides. *Biochem Biophys Acta- Mol Bases of Diseases* 2003; 1637: 46-54.
55. Nagababu E, Christ FJ, Rifkind JM. Hydrogen-peroxide induced heme degradation in red blood cells: protective roles of catalase and hydrogen peroxide. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1620: 211-217.
56. Wenk J, Brennensen P, Wlasek M, Poswig A, Briviba K, Oberley TD, Scharfetter-Kochanek. Stable overexpression of manganese superoxide dismutase in mitochondria identifies hydrogen peroxide as an oxidant in the AP-1 mediated induction of matrix degrading metalloproteases-1. *J Biol Chem* 1999; 274: 25869-25878.
57. Khan AU, Wilson T. Reactive oxygen species as cellular messengers. *Chem Biol* 1995; 2: 437-445.Review.
58. Yano S, Yano Y. Regulating of catalase enzyme activity by cell signaling molecules *Mol Cell Biol* 2002; 240: 119-130.
59. Suzuki YS, Forman HJ, Sevanian A. Oxidant as stimulators of signal transduction. *Free Rad Biol Med* 1997; 22: 269-285.
60. Hansen LL, Ikeda I, Olsen GS, Busch AK, Mostha L. Insulin signaling is inhibited by micromolar concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Biol Chem* 1999; 274: 25 078-25 084.
61. Tirosh A, Rudich A, Potashnik R, Bashan N. Oxidative stress impairs insulin but not platelet-derived growth factor signaling in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem J* 2001; 355: 757-763.
62. Cirri P, Chiarugi TP, Buricchi F, Caselli A, Paolo P, Giannoni E, Camici G, Manao R, Raugei G, Ramponi G. Insulin inhibits platelet-derived growth factor-induced cell proliferation. *Mol Biol Cell* 2005; 16: 73-83.
63. Schreck R, Rieber P, Bauerle PA. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messenger in the activation of the NK kappa B transcription factor and HIV-1. *EMBO J* 1991; 10: 2247-2258.
64. Schmidt KN, Amstad P, Cerutti P, Baeurle PA. The roles of hydrogen peroxide and superoxide as messengers in the activation of transcription factor NF-kappa B. *Chem Biol* 1995; 2: 13-22.
65. Meyer M, Schreck R, Baeurle PA. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and antioxidants have opposite effects on activation of NF-kappa B and AP-1 in intact cells. *EMBO J*. 1993; 12: 2005-2015.
66. Takada Y, Mukhopadhyay A, Kundu GC, Mahabeleshwar GH, Singh S, Aggarwal BB. Hydrogen peroxide activates NK-kappa B through tyrosine phosphorylation of I kappa B alfa and serine phosphorylation of p65. *J Biol Chem* 2003; 278: 24 233- 24 241.
67. Torrie LJ, MacKenzie CJ, Paul A, Plevin R. Hydrogen peroxide-mediated inhibition of liposaccharide-stimulated inhibitory kappa B kinase activity in rat aortic smooth muscle cells. *Brit J Pharmacol* 2001; 134: 393-401.

68. Cai H, Davies ME, Drummond GR, Harrison DG. Induction of endothelial NA synthase by hydrogen peroxide via a  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II/Janus kinase 2-dependent pathway. *Arterioscler Thromb Vas Biol* 2001; 21: 1571-1576.
69. Burdon RH. Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation. *Free Radical Biol Med* 1995; 18:b 775-794. Review.
70. Pantopoulos K, Mueller S, Artzberger A, Ansorge W, Stremmel W, Hentze MW. Differences in the regulation of iron regulatory protein (IRP-1) by extra and intracellular oxidative stress. *J Biol Chem* 1997; 272: 9802-9808.
71. Lee SL, Simon AR, Wang WW, Faburg BL.  $\text{H}_2\text{O}_2$  signals 5-HT-induced ERK MAP kinase activation and mitogenesis of smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001; 281: L646-652.
72. Vepa S, Scriber WM, Parinandi NL, English D, Garcia JGN, Natarjan V. Hydrogen peroxide stimulates tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase in vascular endothelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 1999; 277: L150-L158.
73. Denu JM, Tanner KG. Specific and reversible inactivation of protein tyrosine phosphatases by hydrogen peroxide: Evidence for a sulphenic acid intermediate and implication for redox regulation. *Biochem* 1998; 37: 5633-5642.
74. Sen CK, Packer L. Antioxidants and redox regulation of gene transcription *FASEB J* 1996; 10: 709-720. Review.
75. Clement MV, Ponton A, Pervaiz S. Apoptosis induced by hydrogen peroxide is mediated by decreased superoxide anion concentration and reduction of intracellular milieu. *FEBS Letts* 1998; 440: 13-18.
76. Park S, Han SS, Park CH, Hahm ER, Lee SJ, Park HK, Lee SH, Kim WS, Jung CW, Park K, Riordan HD, Kimler BF, Kim K, Lee JH. L-ascorbic acid induces apoptosis in acute myeloid leukemia cells via hydrogen peroxide-mediated mechanisms. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36: 2180-2195.
77. Hampton MB, Orrenius S. Dual regulation of caspase activity by hydrogen peroxide: implication for apoptosis. *FEBBS Letts* 1997; 414: 552-556.
78. Evans JL, Maddux BA, Goldfine ID. The molecular basis for oxidative stress-induced insulin resistance. *Antioxidant Redox Signaling* 2005; 7: 1040-1052.
79. Goldstein BJ, Kalyankar M, Wu XD. Redox paradox-Insulin action is facilitated by insulin-stimulated reactive oxygen species with multiple potential signaling targets. *Diabetes* 2005; 54: 311-321.
80. Góth L. A kataláz enzim szerepe a hidrogénperoxid metabolizmusban, az enzim csökkent működése vagy veleszületett hiánya. *Orvosképzés* 1997; 72: 59-63. **[3]**
81. Góth L. Az oxidatív stressz és a kataláz enzim. *DOTÉ, Egészségügyi Főiskolai Kar Tudományos Közleményei*. Nyíregyháza 1998; 1: 73-80. **[2]**
82. Góth L. A kataláz enzim klinikai vonatkozásai és mutáció Magyarországon. *Lege Artis Medicinæ* 2005; 15:274-278. **[4]**
83. Chance B. Intermediate compound in the catalase-hydrogen peroxide reaction. *Acta Chem Scand* 1947; 1: 236.
84. Chance B, Sies H, Bovaris A. Hydrogen peroxide metabolism in mammalian organs. *Phys Rew* 1979; 59: 527-615.
85. Góth L. Kandidátusi értekezés 1984. MTA Biol Oszt.
86. Chance B. The primary and secondary compounds of catalase and methyl or ethyl peroxide. II Kinetics and activity. *J Biol Chem* 1949; 179: 1341-1369. IV. Reaction with hydrogen peroxide. *J Biol Chem* 180: 947-957.
87. Chance B. The mechanism of catalase action. *Arch Biochem Biophys* 1952; 37: 301.
88. Murphy MRN, Reid TJ, Sicignano A, Tanaka N, Rossmann MG. The structure of beef liver catalase. *J Mol Biol* 1981; 152: 465-489.

89. Fita I, Rossmann MG. The active center of catalase. *J Mol Biol* 1985; 185: 21-37.
90. Halliwell B, Clement MV, Long LH. Hydrogen peroxide in human body. *FEBBS Letts* 2000; 486: 10-13.
91. Putnam CD, Arvai AS, Bourne Y, Tailner JA. Active and inhibited catalase structures: Ligand and NADPH binding and catalytic mechanism. *J Mol Biol* 2000; 296: 295-309.
92. Diaz A, Horjales E, Rudino-Pinera E, Arreola R, Hansberg W. Unusual Cys-Tyr covalent binding in a large catalase. *J Mol Biol* 2004; 342: 971-985.
93. CAT. <http://www.hgmd.org>.
94. Quan F, Korneluk RG, Tropak MB, Gravel RA. Isolation and characterization of the human catalase gene. *Nucleic Acid Res* 1986;14: 5321-5333.
95. Bell GI, Najarian RC, Mullenbach GT, Hallewell RA. cDNA sequence coding for human kidney catalase. *Nucleic Acid Res* 1986; 14: 5561-5562.
96. Góth L. A hidrogénperoxid paradoxon. *Orvosi Hetilap*. Felkérésre készült közlemény in pres. [5]

## **2. 2. 2. A kataláz enzim szintézise**

A kataláz fehérjeszintézise hasonlóan más fehérjékhez, a riboszómákon történik a kataláz génről történő aminosav szintézis során. A kataláz alegység signal protein révén jut(hat) be a peroxiszómákba. A peroxiszómákban történik a hem beépülése, majd a dimer és tetramer képződés. Az enzimatikusan aktív kataláz enzim négy azonos alegységből épül fel, és minden alegység egy hem csoportot tartalmaz [1].

Az egyes állati és humán szervek, például a máj, nagy kataláz tartalma, az enzim nagyon hatékony szubsztrátbontó képessége (1 molekula kataláz akár 1 millió hidrogénperoxid molekulát is el tud bontani 1 perc alatt), a szubsztrát és ennek, valamint a képződő oxigénnek, mint terméknek az aránylag egyszerű meghatározási módjai együttesen eredményezték, hogy az 1900-as évek első éveiben már a humán cadaver szövetek kataláz aktivitását vizsgálták [2]. Ezen vizsgálatok az enzimdiagnosztika egyik első (1908) alkalmazásának tekinthetők [3], amikor a máj kataláz aktivitásának csökkenését észlelték tumoros elváltozásoknál.

### **2. 2. 2. 1. A máj kataláz aktivitásának csökkenése tumoros elváltozásokban**

A májszövet csökkent kataláz aktivitását e megbetegedésben először Blumental [4] 1920-ban és Rosenthal [5] 1921-ben írták le. Ezen eredmények ismeretében a tumorkutatás egyik, több évtizeden át tartó irányzatává vált a kataláz és a tumor viszonyának vizsgálata. Ez a kutatási irányzat főként az Egyesült Államokban és Japánban volt kedvelt, már az 1950-es évek előtt is.

Az Egyesült Államokban kimutatták, hogy a máj kataláz aktivitásának csökkenése arányos a tumor nagyságával és a tumor eltávolítása után a máj kataláz aktivitás normalizálódik [6].



Japánban a tudósok szeparáltak a tumoros szövetből egy olyan anyagot, amely *in vivo* csökkentette a kataláz aktivitást. Erről az anyagról a további vizsgálatok kiderítették, hogy egy polipeptid, amely hő-, sav- rezisztens és hatását csak élő szövetben tudja kifejteni. Ezt a toxikus anyagot Nakahara és Fukuoka toxohormonnak nevezte el [7].

A kutatások tovább folytak az 1950-es évek után is Japánban, amikor Kashiwagi munkatársaival 1972-ben tisztázta, hogy a tumoros máj kataláz aktivitás csökkenés nem az enzim inhibíciójának, hanem a szintézis csökkenésének tulajdonítható [8].

Szintén Japánban, ugyancsak az 1970-es években Uenoyama és mtsai [9] a kérdést tovább vizsgálva kimutatták, hogy a kataláz enzim szintézise egy aktiváló ( $F_{akt}$ ) és egy inhibíciós ( $F_{inh}$ ) faktor együttes hatásának eredménye. Az inhibíciós faktor a poliriboszómákhoz kötődve akadályozza a szintézist, míg az aktiváló faktor vagy megszünteti az inhibíciós faktor és a poliriboszóma közötti kötést, vagy inaktíválja az inhibíciós faktort. Ezen eredmények alapján azt vélték, hogy a daganatos szövetekben fokozottan képződik az inhibíciós faktor, ami az enzim szintézisének csökkenését eredményezi.

A tumorokban mérhető kataláz aktivitás csökkenést a későbbiekben a májszöveten kívül tanulmányozták különböző sejtenyészetekben és vérben is [10, 11].

A tumorokban mért kataláz aktivitás csökkenés napjainkig vizsgált téma a japán kutatók számára. Sato és mtsai [12] 1992-ben beszámoltak arról, hogy sikeresen izoláltak egy 35 kD nagyságú nukleáris proteint, ami hepatoma sejtekben a silencer részhez kötődve csökkenti a kataláz szintézist és meghatározták azt a szekvenciát (5'-TGGGGGGAG-3'), amelyhez ez a protein kapcsolódik. Ez a mag protein nem található meg a normál patkány májsejtekben. Ez az azonosított nukleáris faktor, amely felelős a tumoros sejtekben a kataláz szintézis csökkenéséért, feltehetően nem más, mint az Uenoyama [9] által leírt inhibíciós faktor.

Az újabb molekuláris biológiai eredmények alapján magyarázható az a korábbról ismert tény, hogy a különböző szervek eltérő (máj nagyon magas, szív közepes, pancreas, agy nagyon alacsony [13]) kataláz tartalma a kataláz enzim szövetspecifikus szabályozásának és főként a különböző szabályozási helyeknek tulajdonítható [14].

### **2. 2. 2. 2. A kataláz szintézis genetikája**

A kataláz gén 5' flanking régiója nem tartalmazza a szokásos TATA boxokat, de tartalmaz az első 400 bázispárban három CCMT boxot és néhány GC-ben gazdag régiót. Összesen nyolc transzkripció helyet azonosítottak az ATG kodontól számított -110 és -60 közötti régióban. A különböző specíesek

(humán, egér, patkány, baktérium) kataláz génjeiben nagymértékű a homológia [15].

Toda és mtsai [16] a transzkripció iniciációs hely szekvenciáját a következőként határozták meg: GYCMGGCCKCTCYKG, ahol M lehet A vagy C, K lehet G vagy T és Y lehet T vagy C.

Forsberg és mtsai 2001-ben beszámoltak arról, hogy a C és T nukleotid csere a -262 bázispár pozícióban hatással lehet a kataláz szintézisre. A 10 TT genotípusú donor génextpresszióval meghatározott kataláza és 29 donor vér kataláza, amit Western blot analízissel határoztak meg, szignifikánsan magasabb volt, mint a CC genotípusúaké. Ezen eredmények alapján arra a következtetésre jutottak, hogy a vizsgált mutációs hely a transzkripcióban játszhat szerepet [17]. A szerzők vér kataláz aktivitás meghatározási eredményeket nem közöltek és az alacsony vizsgálati szám alapján feltételezésük további megerősítést igényel. Továbbá azt is figyelembe kell venni, hogy a kataláz gén 5' promoter régiója meglehetősen sok mutációt tartalmaz [18].

A kataláz enzim szintézisének iniciálója a gyors és tranziens hidrogénperoxid keletkezés lehet. A keletkező kataláz detoxifikálja a hidrogénperoxidot, majd ezután szintézise csökken. Ezt a folyamatot a mitogenezissel együtt a különböző jelátviteli molekulák szabályozzák [19].

A szabályozásban a tirozin kinázok családjába tartozó c-Abl és Arg vehet részt a Tyr 231 és Tyr 386 aminosavak foszforilálása révén [20].

A kataláz enzim degradációjában a c-Abl és Arg által mediált foszforilációtól függő ubiquitináció és a 26S proteasome játszhat szerepet [21].

### Irodalom

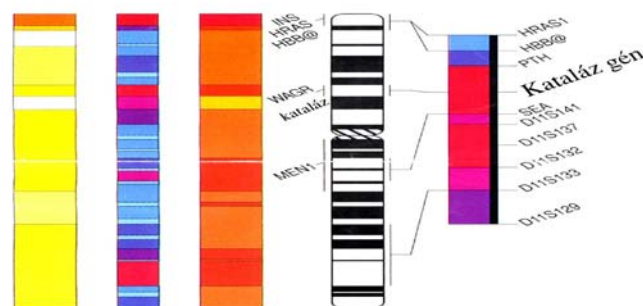
1. Lazarow PB, de Duve C. The synthesis and turnover of rat catalase. *J Cell Biol* 1973; 59: 507-524.
2. Winternitz MC, Melroy CR. *J Exp Med* 1908; 10: 759.
3. Góth L. Az enzimdiagnosztika egyik legkorábbi enzime, a kataláz. *Orvosi Hetilap* 1992; 133: 499-500. [1]
4. Blumenthal F, Brahn B. Die Katalasewirkung in normaler und carcinomatöser Leber. *Z Krebsforsch* 1910; 9: 436-440.
5. Rosenthal E. Investigation on the catalase content of the liver and blood of cancer mice. *Deutsch Med Wschr* 1921; 2270-7.
6. Greenstein JP. *Biochemistry of cancer*. 2<sup>nd</sup> ed. Academic Press, New York, 1954.
7. Nakahara W, Fukuoka F. Toxohormon: A characteristic substance produced by cancer tissue. *GANN* 1949; 40: 45-71.  
Mode of action of toxohormon. A third study on toxohormon. A characteristic toxic substance produced by cancer tissue. *GANN* 1951; 42:436-440.  
The newer concept of cancer toxin. *Adv Cancer Res* 1958; 3: 157-177.
8. Kashiwagi KT, Tobe T, Higashi T, Warabioka K. Impaired synthesis of the liver catalase in tumor-bearing rats. *GANN* 1972; 63: 57-61.
9. Uenoyama K, Ono T. Post-transcriptional regulation of catalase synthesis in rat liver and hepatoma: Factors activating and inhibiting catalase synthesis. *J Mol Biol* 1973; 74: 439-452.

Post-transcriptional regulation of catalase synthesis in rat liver and hepatoma: Binding of inhibiting factor(s) with polyribosomes synthesizing catalase. *J Mol Biol* 1973; 74: 453-466.

10. Potter VR. Biochemistry of cancer. In Holland JF, Frei E. eds. *Cancer Medicine*, Lea and Febiger, Philadelphia 1977, p178.
11. Góth L. Hypocatalasemia in hospital patients. *Clin Chem* 1996; 42: 341-342. **[26]**
12. Sato K, Ito K, Kohara H, Yamaguchi Y, Adachi K, Endo H. Negative regulation of catalase gene expression in hepatoma cells. *Mol Cell Biol* 1992; 12: 2525-2533.
13. Góth L. Determination of catalase enzyme activity in human tissues by programmable polarograph. *Hungarian Scientific Instruments* 1982; 53: 43-46.
14. Van Remmen H, Williams MD, Yang H, Walter CA, Richardson A. Analysis of the transcriptional activity of the 5'-flanking region of the rat catalase gene in transfected cells and in transgenic mice. *J Cellular Physiol* 1998; 174: 18-26.
15. Nakasima H, Yamamoto M, Goto K, Osumi T, Hashimoto T. Isolation and characterization of the rat catalase-encoding gene. *Gene* 1989; 79: 279-288.
16. Toda H, Takeuchi T, Hori N, Ito K, Sato K. Inverted repeats in the TAT-less promoter of the rat catalase gene. *J Biochem* 1997; 121: 1035-1040.
17. Forsber L, Lyrenas L, de Faire U, Morgernstern R. A common functional C-T substitution polymorphism in the promoter region of the human catalase gene influences transcription factor binding, reporter gene transcription and is correlated to blood catalase levels. *Free Radical Biol Med* 2001; 30: 500-505.
18. Góth L: Catalase enzyme mutations and their association with diseases. *Molecular Diagnosis* 2004; 8:141-149. Review. **[46]**
19. Yano S, Yano N. Regulation of catalase enzyme activity by cell signaling molecules. *Mol Cell Biochem* 2002; 240: 119-130.
20. Cao C, Leng Y, Kufe D. Catalase activity is regulated by c-abl and Arg in the oxidative stress response. *J Biol Chem* 2003; 278: 29667-29675.
21. Cao C, Leng Y, Liu X, Yi YP, Li P, Kufe D. Catalase is regulated by ubiquitination and proteosomal degradation. Role of the c-Abl and Arg tyrosine kinases. *Biochem* 2003; 42:10248-10353.

### 2. 2. 2. 3. A kataláz gén

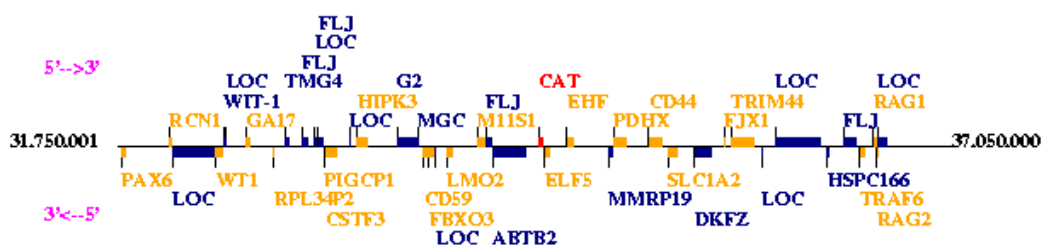
A humán kataláz fehérjét kódoló kataláz gén a 11-es kromoszóma rövid karján a 13-as pozícióban található [1, 2].



A kataláz gén lokalizációja a 13-as kromoszómán

A kromoszómán a fehér sávban (WAGR: Wilms' tumor-gonadoblastoma, aniridia komplex-Kataláz) a következő gének találhatóak: Wilms' tumor, Aniridia 2, Kataláz, Leukémia acute T sejt.

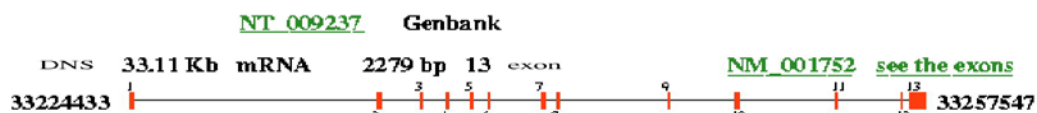
A Human Genome Mutation Database 2005 [3] adatai már sokkal részletesebbek, amely szerint a kataláz körbevevő gének a következők: CD59 antigén, kettőskortin domént tartalmazó protein I, elongációs protein 4, follicule-stimuláló hormon beta protein polipeptid, homeo-domén interaktív protein kináz 3, LIM domén 3, myopia 7, páros boxú homeotikus gén 6, piruvát-dehidrogenáz komplex, rekombinációt aktiváló gén 1 és 2, reticulocalbin 1, T-cell leukemia/lymphoma 2, Wilms tumor 1.



A kataláz gén környezete a 11p13 kromoszómán.  
Világos szín: genetikai kapcsolat, sötét szín: lokusz kapcsolat

A kataláz gén mintegy 33 114 kb hosszúságú és 13 exont (1587 bp) és 12 intront foglal magába, az első nukleotid a 33 224 433, míg az utolsó 33 257 547.

### A human kataláz gén exonjai és intronjai



Az 5' vég 68 bp hosszúságú nem kódoló régiót és 1-320 bp flanking régiót tartalmaz, míg ez a régió a 3' végnél 747 bp [4,5].

5' flanking

```

-320                -300                -280                -260
gtcccagggcggcctgaag gatgctgataaccgggagcc ccgccctgggttcggctatc ccgggcacccc
    -240                -220                -200
gggccggcg gggcgaggctctccaattgc tgggccagagcgggaccctt ccttccgcaccctcctgggt
-180                -160                -140                -120

```

atctccggtcttcaggcct ccttcggagagccctgctcc gagccattgggcttccaat ctggcctgcc  
 -100 -80 -60  
 tagcgccg agcagccaatcagaaggcagtt cctcccagggggcggggacg agggggtggtgctgattggct  
 -40 -20 ← -1  
 gagcctgaagtcgccacgg actcggggcaacaggcagat t

5' nem kódoló 60 40 20  
**TGCCTGCTG AGGGTGGAGACCCACGAGC CGAGGCCTCCTGCAGTGTTC TGCAC**  
 ← 1 e1→  
 AGCAAACCGCACGCT ATG GCT GAC AGC CGG GAT CCC GCC AGC GAC CAG  
 Met Ala Asp Ser Arg Asp Pro Ala Ser Asp Gln  
 e2→  
 ATG CAG CAC TGG AAG GAG CAG CGG GCC GCG CAG AAA GCT GAT GTC CTG  
 Met Gln His Trp Lys Glu Gln Arg Ala Ala Gln Lys Ala Asp Val Leu  
 ACC ACT GGA GCT GGT AAC CCA GTA GGA GAC AAA CTT AAT GTT ATT ACA  
 Thr Thr Gly Ala Gly Asn Pro Val Gly Asp Lys Leu Asn Val Ile Thr  
 GTA GGG CCC CGT GGG CCC CTT CTT GTT CAG GAT GTG GTT TTC ACT GAT  
 Val Gly Pro Arg Gly Pro Leu Leu Val Gln Asp Val Val Phe Thr Asp  
 GAA ATG GCT CAT TTT GAC CGA GAG AGA ATT CCT GAG AGA GTT GTG CAT  
**Glu Met Ala His Phe Asp Arg Glu Arg Ile Pro Glu Arg Val Val His**  
 e3→  
 GCT AAA GGA GCA GGG GCC TTT GGC TAC TTT GAG GTC ACA CAT GAC ATT  
 Ala Lys Gly Ala Gly Ala Phe Gly Tyr Phe Glu Val Thr His Asp Ile  
 ACC AAA TAC TCC AAG GCA AAG GTA TTT GAG CAT ATT GGA AAG AAG ACT  
 Thr Lys Tyr Ser Lys Ala Lys Val Phe Glu His Ile Gly Lys Lys Thr  
 e4→  
 CCC ATC GCA GTT CGG TTC TCC ACT GTT GCT GGA GAA TCG GGT TCA GCT  
 Pro Ile Ala Val Arg Phe Ser Thr Val Ala Gly Glu Ser Gly Ser Ala  
 GAC ACA GTT CGG GAC CCT CGT GGG TTT GCA GTG AAA TTT TAC ACA GAA  
 Asp Thr Val Arg Asp Pro Arg Gly Phe Ala Val Lys Phe Tyr Thr Glu  
 GAT GGT AAC TGG GAT CTC GTT GGA AAT AAC ACC CCC ATT TTC TTC ATC  
**Asp Gly Asn Trp Asp Leu Val Gly Asn Asn Thr Pro Ile Phe Phe Ile**  
 e5→  
 AGG GAT CCC ATA TTG TTT CCA TCT TTT ATC CAC AGC CAA AAG AGA AAT  
**Arg Asp Pro Ile Leu Phe Pro Ser Phe Ile His Ser Gln Lys Arg Asn**  
 CCT CAG ACA CAT CTG AAG GAT CCG GAC ATG GTC TGG GAC TTC TGG AGC  
**Pro Gln Thr His Leu Lys Asp Pro Asp Met Val Trp Asp Phe Trp Ser**  
 e6→  
 CTA CGT CCT GAG TCT CTG CAT CAG GTT TCT TTC TTG TTC AGT GAT CGG  
**Leu Arg Pro Glu Ser Leu His Gln Val Ser Phe Leu Phe Ser Asp Arg**  
 GGG ATT CCA GAT GGA CAT CGC CAC ATG AAT GGA TAT GGA TCA CAT ACT  
**Gly Ile Pro Asp Gly His Arg His Met Asn Gly Tyr Gly Ser His Thr**  
 TTC AAG CTG GTT AAT GCA AAT GGG GAG GCA GTT TAT TGC AAA TTC CAT  
**Phe Lys Leu Val Asn Ala Asn Gly Glu Ala Val Tyr Cys Lys Phe His**  
 e7→  
 TAT AAG ACT GAC CAG GGC ATC AAA AAC CTT TCT GTT GAA GAT GCG GCG

**Tyr Lys Thr Asp Gln Gly Ile Lys Asn Leu Ser Val Glu Asp Ala Ala**

AGA CTT TCC CAG GAA GAT CCT GAC TAT GGC ATC CGG GAT CTT TTT AAC  
Arg Leu Ser Gln Glu Asp Pro Asp Tyr Gly Ile Arg Asp Leu Phe Asn

GCC ATT GCC ACA GGA AAG TAC CCC TCC TGG ACT TTT TAC ATC CAG GTC  
Ala Ile Ala Thr Gly Lys Tyr Pro Ser Trp Thr Phe Tyr Ile Gln Val

ATG ACA TTT AAT CAG GCA GAA ACT TTT CCA TTT AAT CCA TTC GAT CTC  
Met Thr Phe Asn Gln Ala Glu Thr Phe Pro Phe Asn Pro Phe Asp Leu

e8→

**ACC AAG GTT TGG CCT CAC AAG GAC TAC CCT CTC ATC CCA GTT GGT AAA**  
**Thr Lys Val Trp Pro His Lys Asp Tyr Pro Leu Ile Pro Val Gly Lys**

**CTG GTC TTA AAC CGG AAT CCA GTT AAT TAC TTT GTC GAG GTT GAA CAG**  
**Leu Val Leu Asn Arg Asn Pro Val Asn Tyr Phe Ala Glu Val Glu Gln**

**ATA GCC TTC GAC CCA AGC AAC ATG CCA CCT GGC**  
**Ile Ala Phe Asp Pro Ser Asn Met Pro Pro Gly**

e9→

ATT GAG GGC AGT CCT GAC AAA ATG CTT CAG GGC CGC CTT TTT GCC TAT  
Ile Glu Ala Ser Pro Asp Lys Met Leu Gln Gly Arg Leu Phe Ala Tyr

CCT GAC ACT CAC CGC CAT CGC CTG GGA CCC AAT TAT CTT CAT ATA CCT  
Pro Asp Thr His Arg His Arg Leu Gly Pro Asn Tyr Leu His Ile Pro

e10→

GTG AAC TGT CCC TAC CGT GCT CGA GTG GCC AAC TAC CAG CGT GAT GGC  
**Val Asn Cys Pro Tyr Arg Ala Arg Val Ala Asn Tyr Gln Arg Asp Gly**

CCG ATG TGC ATG CAG GAC AAT CAG GGT GGT GCT CCA AAT TAC TAC CCC  
Pro Met Cys Met Gln Asp Asn Gln Gly Gly Ala Pro Asn Tyr Tyr Pro

AAC AGC TTT GGT GCT CCG GAA CAA CAG CCT TCT GCC CTG GAG CAC AGC  
Asn Ser Phe Gly Ala Pro Glu Gln Gln Pro Ser Ala Leu Glu His Ser

ATC CAA TAT TCT GGA GAA GTG CGG AGA TTC AAC ACT GCC AAT GAT GAT  
Ile Gln Tyr Ser Gly Glu Val Arg Arg Phe Asn Thr Ala Asn Asp Asp

e11→

AAC GTT ACT CAG GTG CGG GCA TTC TAT GTG AAC GTG CTG AAT GAG GAA  
Asn Val Thr Gln Val Arg Ala Phe Tyr Val Asn Val Leu Asn Glu Glu

CAG AGG AAA CGT CTG TGT GAG AAC ATT GCC GGC CAC CTG AAG GAT GCA

**Gln Arg Lys Arg Leu Cys Glu Asn Ile Ala Gly His Leu Lys Asp Ala**

e12→

**CAA ATT TTC ATC CAG AAG AAA GCG GTC AAG AAC TTC ACT GAG GTC CAC**  
**Gln Ile Phe Ile Gln Lys Lys Ala Val Lys Asn Phe Thr Glu Val His**

**CCT GAC TAC GGG AGC CAC ATC CAG GCT CTT CTG GAC AAG TAC AAT GCT**  
**Pro Asp Tyr Gly Ser His Ile Gln Ala Leu Leu Asp Lys Tyr Asn Ala**

e13→

**GAG AAG CCT AAG AAT GCG ATT CAC ACC TTT GTG CAG TCC GGA TCT CAC**  
**Glu Lys Pro Lys Asn Ala Ile His Thr Phe Val Gln Ser Gly Ser His**

**TTG GCG GCA AGG GAG AAG GCA AAT CTG TGA**  
**Leu Ala Ala Arg Glu Lys Ala Asn Leu OP**

3'

**GGCCGGGGCCCTGCACCTGTGCAGCGAACGTTAGCGTTCATCCGTGTAACCCGCT**

CATCACTGGATGAAGATTCTCCTGTGCTAGATGTGCAAATGCAAGCTAGTGGCTT  
CAAAATAGAGAATCCCACCTTCTATAGCAGATTGTGTAACAATTTTAATGCTATTT  
CCCCAGGGGAAAATGAAGGTTAGGATTTAACAGTCATTTAAAAAAAAAATTTGTT  
TTGACGGATGATTGGATTATTCATTTAAAATGATTAGAAGGCAAGTTTCTAGCTT  
AGAAATATGATTTTATTTGACAAAATTTGTTGAAATTATGTATGTTTACATATCAC  
CTCATGGCCTATTATATTAATAATATGGCTATAAATATATAAAAAGAAAAGATAAA  
GATGATCTACTCAGAAATTTTATTTTTCTAAGGTTCTCATAGGAAAAGTACATTT  
AATACAGCAGTGTTCATCAGAAGATAACTTGAGCACCGTCATGGCTTAATGTTTAT  
TCCTGATAATAATTGATCAAATTCATTTTTTTCACTGGAGTTACATTAATGTTAAT  
**TCAGCACTGATTTACAACAGATCAATTTGTAATTGCTTACATTTTTACAATAAAT**

### **2. 2. 3. A kataláz gén polimorfizmusai különböző megbetegedésekben [6, 46]**

Az ismert kataláz gén mutációk közül azokat, amelyek nem befolyásolják a fehérje expressziót, nincsenek hatással az enzim aktivitásra, és nincs ismert asszociációjuk valamilyen betegséggel, patológiás eltéréssel, a kataláz gén benignus polimorfizmusai néven foglaltam össze.

A kataláz gén benignus polimorfizmusai az 5' véget, az 1-es intront és az 1-es, 9-es, 10-es exonokat érintik. A gén 5' régiója meglehetősen polimorf, mivel itt írták le a legtöbb mutációt.

Mutáció	Helye	Régió	Hivatkozás	Jellege/asszociáció
<b>Nem kódoló régiók</b>				
C→T	-1167	Flanking	Chystakov 2000 [7]	diabetes
C→T	-262	Flanking	Forsberg 2001 [8]	transzkripció
G→A	-259	Flanking	Jiang 2001 [9]	vérnyomás
A→T	-71	Flanking	Wen 1990 [1]	benignus
C→A	-20	Flanking	Góth 1997 [11]	benignus
C→T	-18	Flanking	Góth 1997 [11]	benignus
C→T	4	5' nem kódoló	Góth 1998 [12]	benignus
A→G	17	5' nem kódoló	Casp 2002 [13]	vitiligo
T→C	20	5' nem kódoló	Kishimoto 1992 [14]	benignus
C→T	44	5' nem kódoló	Góth 1998 [12]	benignus
T→C	49	5' nem kódoló	Wen 1990 [10]	benignus
G→A	-60	1. intron	Góth 2005 [15]	benignus
G→C	5	1. intron	Vitai 2005 [16]	diabetes?
G→A	7	1. intron	Vitai 2005 [16]	diabetes?
T→A	11	1. intron	Góth 2005 [15]	benignus
G→T	61	1. intron	Vitai 2005 [16]	diabetes?
T→C	78	1. intron	Wen 1990 [10]	benignus
G→A	50	3' nem kódoló	Wen 1990 [10]	benignus
<b>Kódoló régiók</b>				
T→C	12	1. exon Ser <sup>3</sup> Ser	Góth 1998 [12]	benignus
A→C	27	1. exon Ser <sup>27</sup> Arg	Góth 1998 [12]	benignus
T→C	111	9. exon Asp <sup>389</sup> Asp	Wen 1990 [10]	benignus
T→C	60	10. exon Leu <sup>418</sup> Leu	Kishimoto 1992 [14]	benignus

### 2. 2. 3. 1. Kataláz gén mutációk és a diabetes mellitus

Egy moszkvai felmérés szerint a 132 kontroll és a 154 2-es típusú diabeteses beteg vizsgálata azt mutatta [7], hogy a C1167T mutáció szignifikánsan gyakoribb a diabeteses egyéneknél. A szerzők ez alapján tételezték fel a diabetes (2 típus) és a kataláz gén ezen mutációjának asszociációját.

Ez a polimorfizmus nem mutatott kapcsolatot az 1-es típusú diabeteses betegeknek kialakuló nephropathia és a fenti mutáció között [17].

Az első közlemény a diabetes mellitus megnövekedett gyakoriságáról (12,7% vs 0%) a veleszületett kataláz hiányban 2000-ben jelent meg [18], és az egész életen át tartó kataláz hiány révén megnövekedhet a hidrogénperoxid koncentrációnak tulajdonítható, ami károsíthatja az oxidációra érzékeny pancreas  $\beta$ -sejteket [15, 19]. Az eddig ismert 5 magyarországi mutáció és a diabetes mellitus nem mutatott kapcsolatot.

A 308 2-es típusú diabeteses betegnél [16] talált exon 2 missense mutációk (T96A és T135A) és az intron 2 kivágási mutáció (G5C) csökkent kataláz aktivitással jártak (59%, 48%, 62%) és hozzájárulhatnak a 2-es típusú



diabetes mellitus kialakulásához. Ezt azonban további vizsgálatoknak meg kell erősíteni, mivel a fenti mutációk gyakorisága meglehetősen alacsony (0,32%). Ezeknél a diabeteses betegeknél talált kis gyakoriságú (<0,65%), kataláz csökkenést nem okozó mutációk az 1-es intronban (G5C, G7A) és a 2-es intronban (G60T) inkább benignus polimorfizmusoknak tekinthetők, mint diabetes kockázati tényezőjének. Az irodalmi adatok alapján hidrogénperoxid mint aktív metabolit, egyre nagyobb számú olyan részfolyamat aktív részvevője, amelyek a diabetes patomechanizmusában játszanak szerepet. Ennek ellenére a hidrogénperoxid koncentrációt szabályozó kataláz enzim hiánya és a diabetes közötti összefüggés vizsgálatával csak nagyon kisszámú közlemény foglalkozik.

### **2. 2. 3. 2. Kataláz gén mutációk és a magas vérnyomás**

Jiang és mtsai [9] 2001-ben számoltak be arról, hogy a négy vizsgált mutáció (C-773T, G-259A, T-21A, A-17G) közül a C-773T mutatott szorosabb korrelációt a hypertoniával ( $p < 0.002$ ). A szerzők feltételezik, hogy a C-773T mutáció létrehoz vagy megszüntet transzkripció faktor kötőhelyet a promoter régióban.

Az eredmények értékelését nehezíti a vizsgálatba bevont személyek (hypertonias: 27, kontroll: 22) alacsony száma és a kataláz aktivitások hiánya.

### **2. 2. 3. 3. Kataláz gén mutációk és a vitiligo**

A vitiligora való hajlamot multifaktoriális eredetűnek tartják, amelyben a melanin bioszintézisében szerepet játszó gének, az oxidatív stressz válasz fehérjék génei, az autoimmun folyamatok szabályozása és környezeti tényezők játszanak szerepet.

Ezekből a lehetséges tényezőkből Casp és mtsai [13] 2002-ben az oxidatív stressz elleni védekező mechanizmusból a kataláz gén mutációját vizsgálták 234 vitiligos és 177 kontroll egyénnél. A vizsgált mutációk a következők: T20C a flanking régióban, T60C a 10. exonban és T111C a 9. exonban.

A vizsgált 3 mutáció közül csak a T111C szubsztitúció a 9. exonban mutatott kapcsolatot a vitiligoval. A mutáció szerepét, amely nem jár aminosav változással (Asp<sup>389</sup>Asp), a szerzők azzal magyarázzák, hogy a C allél, amely gyakoribb a vitiligos betegeknél, lehet felelős a hajlamért. A mutáció jelentőségét, magyarázatát nem növeli az a tény, hogy a szerzők közleményükben nem számolnak be a kataláz aktivitásokról.

Más szerzők már korábban csökkent kataláz aktivitást találtak a vitiligos betegek epidermájában [20].

### **2. 2. 3. 4. Kataláz gén mutációk és az Alzheimer kór**

Az oxidatív stressz az egyik olyan folyamat, amely hozzájárulhat az Alzheimer kór patomechanizmusához. A csökkent kataláz enzim aktivitás a hidrogénperoxid akkumulációját eredményezheti, amely több neurotoxikus folyamatot indukálhat és ezáltal hozzájárulhat a neurális károsodásokhoz.

Goulash és mtsai 2002-ben 137 Alzheimer kóros betegnél és 130 kontroll egyénnél vizsgálta ezen célból a kataláz gén flanking régiójában C262T nukleotid szubsztitúciót [21]. Ezen mutáció esetén a vizsgálati eredmények a két csoportnál nem mutattak különbséget ( $p > 0,5$ ).

Annak ismeretében, hogy az agyszövet alacsony kataláz aktivitású és ennek az oxidatív stressz elleni védelmét is a vér kataláz van hivatott ellátni, több klinikai jellegű közlemény lenne elvárható.

### **2. 2. 3. 5. Kataláz gén mutációk és a tumorok**

A máj és vér kataláz aktivitásának csökkenése régóta ismert és széleskörűen tanulmányozott, mint ezt a kataláz szintézis fejezetben részletesen ismerttettem.

Jelen tudásunk szerint a csökkent kataláz aktivitás nem a kataláz gén mutációinak tulajdonítható, hanem a kataláz szintézis csökkenésének, amelynek természetesen lehetnek genetikai okai akár a kataláz gén 5' részén, akár a más génekben kialakult főként szomatikus mutáció(k) révén.

#### **Irodalom**

1. Wiecker P, Mueller CR, Mayerova A, Grezeschik KH, Ropers HH. Assignment of the gene coding for human catalase to the short arm of chromosome 11. *Am Genet* 1980; 27: 73-77.
2. Schroeder WT, Saunders GF. Localization of the human catalase and apolipoprotein A-1 genes to chromosome 11. *Cytogenet Cell Genet* 1987; 44: 231-233.
3. Human Genom Mutation Database. Institute of Medical Genetics in Cardiff. <http://www.hgmd.org>.
4. Bell GI, Najarian RC, Mullenbach GT, Hallewell RA. cDNA sequence coding for human kidney catalase. *Nucl Acid Res* 1986; 14: 5661-5662.
5. Quan F, Korneluk RG, Tropak MB, Gravel RA. Isolation and characterization of the human catalase gene. *Nucl Acid Res* 1986; 14: 5231-5235.
6. Góth L, Rass P, Páy A. Catalase enzyme mutations and their association with diseases. *Mol Diagn* 2004; 8: 141-149. [46]
7. Chystakov DA, Savastyanov KV, Turakulov RI et al. The c1167T polymorphism of the catalase gene and polymorphic markers D11S907 and D11S2008 located in the vicinity are associated with diabetes mellitus type 2. *Mol Biol* 2000; 34: 733-736.
8. Forsberg L, Lyrenas L, deFaire U, Morgenstein R. A common functional C-T substitution in the promoter region of the human catalase gene influences transcription factor binding,

- reporter gene transcription and is correlated to blood catalase levels. *Free Radical Biol Med* 2001; 30: 500-505.
9. Jiang Z, Akey IM, Shi J, Xiong M, Wang Y, Shen Y, Xu X, Chen H, Wu H, Xiao J, Lu D, Huang W, Jin L. A polymorphism in the promoter region of catalase is associated with blood pressure. *Hum Genet* 2001; 109: 95-98.
  10. Wen JK, Osumi T, Hashimoto T, Ogata M. Molecular analysis of human acatalasemia *J Mol Biol* 1990; 211: 383-393.
  11. Góth L, Vitai M. Polymorphism of 5' uncoding region of the catalase gene in Hungarian acatalasemia and hypocatalasemia. *Electrophoresis* 1997; 18: 1105-1108. [44]
  12. Góth L. Genetic heterogeneity of the 5' uncoding region of the catalase gene in Hungarian acatalasemic and hypocatalasemic subjects. *Clin Chim Acta* 1998; 271: 73-78. [45]
  13. Casp CB, She JX, McCormack WT. Genetic association of the catalase gene (CAT) vitiligo susceptibility. *Pigment Cell Res* 2002; 15: 62-66.
  14. Kishimoto Y, Murakami Y, Hayashi K, Takahara S, Sugimura T, Sekiya T. Detection of a common mutation of the catalase gene in Japanese acatalasemic patients. *Hum Genet* 1992; 88: 487-490.
  15. Góth L, Vitai M, Rass P, Sükei E, Pay A. Detection of a novel familial catalase mutation (Hungarian type D) and the possible risk of inherited catalase deficiency for diabetes mellitus. *Electrophoresis* 2005; 26: 1646-1649. [51]
  16. Vitai M, Fatrai S, Rass P, Csordas M, Tarnai I. Simple PCR-heteroduplex,-SSCP mutation screening methods for detection of catalase mutations in Hungarian patients with type 2 diabetes mellitus. *Clin Chem Lab Med* 2005; 43: 1346-1350.
  17. Chystakov DA, Savastyanov KV, Chuganova LA, et al. Association study of C1167T polymorphism of the catalase gene and D6S392 locus nearby the Mn-dependent superoxide dismutase gene with diabetic microangiopathy. *Ter Ark* 2002; 74: 26-30.
  18. Góth L, Eaton JW. Hereditary catalase deficiencies and increased risk of diabetes. *Lancet* 2000; 356: 1820-1821. [32]
  19. Góth L, Lenkey A, Bigler WN. Blood catalase deficiency and diabetes in Hungary. *Diab Care* 2001; 24: 1839-1840. [28]
  20. Schallreuter KU, Wood JM, Berger J. Low catalase levels in epidermis of patients with vitiligo. *J Invest Dermatol* 1991; 97: 1081-1085.
  21. Goulas A, Fidani L, Kotsis A, Mirtsou V, Petersen RC, Tangalos E, Hardy J. An association study of a functional catalase gene polymorphism, -262C->T, and patients with Alzheimer's disease. *Neurosci Letts* 2002; 330: 210-212.

#### **2. 2. 4. Az akatalazémia**

Az akatalazémia, a kataláz enzim veleszületett hiányának homozigóta formája. Ez a veleszületett enzimhiányoknak is az egyik első leírása [1], amely a japán Takahara Shigoko nevéhez fűződik.

Takahara szájsebész professzor 1946 december 25-én egy 11 éves kislányt kezelt láz, fogínygyulladás, orális gangrena és a jobb oldali nasalis üregben lévő tumor miatt. Miután a tumort eltávolította, a vérző műtéti helyet az akkor szokásos módon hidrogénperoxiddal akarta fertőtleníteni. A hidrogénperoxid hatására azonban nem indult meg az oxigén buborék képződés, és a vér barnás-feketére változott. Először azt gondolta, hogy tévedésből

ezüst-nitrátot használt és ezért megismételte az öblítést frissen készített hidrogénperoxid oldattal. Az eredmény ugyanaz lett.

Takahara ezután azt feltételezte, hogy a kislány véréből hiányzik a kataláz enzim, amely elbontaná a hidrogénperoxidot.

A kislány édesanyja szerint a hat gyermeke közül még kettőnél (egy fiú és egy leány) hasonló tünetek tapasztalhatók. A gyermekek kataláz vizsgálata (fülcimpából történő vérvétel, amelyhez hidrogénperoxidot cseppentett) az enzim hiányát még három esetben detektálta.

A jelenséget Takahara még további 2 családnál észlelte és a permanganometriás hidrogénperoxid meghatározást alkalmazva a következő kataláz aktivitás (catalase index) eredményeket kapta.

Beteg	Alsó határ	Felső határ	Középérték	n
Akatalazémiás család				3
Akatalazémiás egyén	0,0	0,1	0,0	9
Nem akatalazémiás	3,4	7,2	5,5	45
Kontroll csoport	4,3	9,5	7,4	20

Az akatalazémiás egyéneknél tapasztalt orális gangrena, fogínygyulladás, foghiány oka, Takahara szerint, a szájban a hemoliticus staphylococcusok és pneumococcusok által termelt hidrogénperoxid oxidatív szövetkárosító hatása.

A katalázhiány több generáción volt nyomon követhető és a három akatalazémiás családban a szülők első vagy másodfokú unokatestvérek voltak [2-6].

Az akatalazémia elnevezés valójában egy kicsit félrevezető, mivel a homozigóta mutánsoknál is detektálható kismértékű (<10%) kataláz aktivitás. A hypokatalazémia (≈50%) elnevezés megfelelőbb lehetne, de ez a veleszületett kataláz hiány heterozigóta formájára használatos [7].

Az akatalazémiát az 1948-as felfedezése óta a világ 12 országában detektálták.

A földrészek, országok és a felismerésük ideje a következő: Ázsia: Japán: 1948, Korea:1968, Közel Kelet: Irán: 1984, Amerika: USA: 1963, Mexikó: 1974, Peru: 1977, Kanada: 1995, Svájc: 1961, Izrael: 1963, Németország: 1977, Ausztria: 1988, Magyarország: 1992.

Napjainkig 114 akatalazémiás egyénről számoltak be az irodalomban [7-14], akik 61 akatalazémiás családban a világ 12 országában találhatók.

Az akatalazémiások többségét (91) Japánban detektálták, míg kevesebbet Svájcban (11) és Magyarországon (2). Ezen országokban az akatalazémiás egyének és családjaik részletes vizsgálata megtörtént. A többi esetekben sporadikus volt az előfordulás és a katalázhiányon túlmenően további jellemzés/vizsgálat nem történt.

A korábról ismert Japán és Svájci akatalazémia a következőkkel jellemezhető:

	<b>Japán típus</b>	<b>Svájci típus</b>
Projektvezető	Takahara S	Aebi H
Akatalazémiás család	45	3
Akatalazémiások	90	11
Férfi/Nő	44/47	06.máj
Takahara tünet	~50% 1952-ig	nem detektálható
Vér kataláz:		
Akatalazémiás	0,5-2,0%	0-3,2%
Hypokatalazémiás	60-80%	57%
Szöveti kataláz	<15%	39-50%
Kataláz protein	nincs változás	megváltozott
Génmutáció	2 típus 5 betegnél	feltételezett szabályozás?
Gyakoriság:		
Akatalazémia	0,08/1000	0,04/1000
Hypokatalazémia	0,5/1000	nincs adat

#### **2. 2. 4. 1. A veleszületett katalázhiány klinikai tünetei (Takahara?)**

A veleszületett katalázhiány speciális klinikai tünetek hiányában véletlenszerűen került felfedezésre Japánban.

A Takahara tünet (Takahara disease) néven ismert jelenség az orális gangrena, amely az 1950-es évek elejéig az akatalazémiások mintegy felénél volt megtalálható. A később detektált egyéneknél már csak szórványosan és a még későbbi években már Japánban sem detektálták. Ezek alapján érthető, hogy ez a tünet csak részben tulajdonítható a kataláz hiánynak. A további okok az 1948-1950-es évek Japán különösen szegényes táplálkozási viszonyai és az alapvető szájhigiéncia hiánya voltak. Ezt támasztja alá, hogy ezen feltételek javulásával csökkent a tünetek gyakorisága [15] és a később sem a Japánban, sem a más országokban detektált akatalazémiás egyéneknél nem volt megtalálható.

Ezen érdekes megfigyelések a Japán akatalazémiáról az 1960-as évek elején arra inspirálták Aebi H svájci biokémikus professort, hogy csatlakozzon a veleszületett katalázhiányt vizsgáló tudósokhoz. A katalázhiány speciális klinikai tüneteinek hiányában, Aebi szűrőprogramot tervezett ennek felderítésére.

Egyszerű vér kataláz meghatározási módszerrel vizsgálta a katonai sorköteleseket és csökkent kataláz aktivitás esetén bevonta a vizsgálatba a családtagokat is [16]. A meghatározási módszer a következő volt: 1 csepp NaCl oldattal hígított vérhez 1 csepp 3-5%-os pufferolt (foszfát puffer, pH: 7,2) hidrogénperoxidot adtak és figyelték a buborékképződést.

18 459 egyén vizsgálatának eredményeként találtak kettő akatalazémiás egyént. A családtagok bevonása után 3 családban 11 akatalazémiás egyénről számoltak be. Az 1960-as években rendelkezésre álló vizsgáló módszerekkel főként a kataláz fehérje biokémiai jellemzése volt kivitelezhető. Ezen akatalazémiás egyének között ő sem észlelte a Takahara tünetet.

Ezek alapján állítható, hogy az akatalazémiához speciális klinikai tünetek nem társulnak.

Japán szerzők [14] 2004-ben a következő esetről számoltak be, amely egy tokiói kórházban történt.

Egy 71 éves férfi beteget operáltak laryngenalis tumor miatt és a szokásos módon a szájüreget 300 ml 1:2 arányban hígított 3%-os hidrogénperoxiddal fertőtlenítették. Az anasztésia során észlelték, hogy a beteg methemoglobin koncentrációja 11%-ra emelkedett, ami aszkorbinsav adására 7,5%-ra csökkent és három nap múlva normalizálódott (0,5%). A jelenség okát kutatva, Japánban lévén, gondoltak a kataláz hiányra és az elvégzett gyorseszteszt (azonos Takahara első detektálási módszerével) ezt is igazolta. Az oxigénfejlődés elmaradt és a vér sötétbarnára színeződött. A később elvégzett kvantitatív vér kataláz mérés (Beutler eljárása) mintegy 1%-nyi kataláz aktivitást mutatott. A család vizsgálatakor az anya és három gyermek hypokatalazémiásnak bizonyult. Az apa, aki az anya unokatestvére volt, már korábban meghalt.

Ez talán az egyik első eset a tumor lysis szindróma után, ahol a veleszületett tünetmentes katalázhiány súlyos elváltozást (methemoglobin képződést) eredményezett, amikor a beteget fokozott hidrogénperoxid hatás érte.

Ezek alapján a fokozott hidrogénperoxidot produkáló beavatkozások előtt célszerű lenne vér kataláz aktivitást mérni a hasonló komplikációk megelőzésére.

#### **2. 2. 4. 2. Az akatalazémia biokémiai és genetikai jellemzése**

Az akatalazémia két típusának (a Japán és a Svájci) definiálása a veleszületett katalázhiányos egyének részletes biokémiai vizsgálatán alapszik. A világ többi országában detektált akatalazémiásoknál ezek a vizsgálatok nem történtek meg, így ezek típusa nem ismert.

A kataláz hiányos egyének kataláza az elektroforézis során a Japán típusnál nem tér el a normokatalazémiás kontrolloktól.

A Svájci típusnál megváltozott elektroforetikus mobilitás detektálható és a kataláz hiány a vörösvértestekben jelentősebb, mint az egyéb (máj)



## Irodalom

1. Góth L. Az enzimdiagnosztika egyik legkorábbi enzime, a kataláz. Orvosi Hetilap 1992: 133: 499-500. [\[1\]](#)
2. Takahara S, Miyomoto H. Three cases of progressive oral gangrene due to lack of catalase in the blood (in Japanese). Nihonn Jibi Inkoka Gakkai Kaiho (J Otorhinolaryngological Soc Japan: Japn J Otol) 1948: 51: 163.
3. Takahara S, Miyomoto H. Oto-rhino Laryng Clin 1949: 2: 21.
4. Takahara S. J Okayama Med Soc 1951: 1: 63.
5. Takahara S. Proc imp Acad, Japan 1951: 27: 6.
6. Takahara S. Progressive oral gangrene probably due to lack of catalase in the blood (acatalasemia). Lancet 1952: 2: 1101-1104.
7. Eaton JW, Ma M. Acatalasemia. In The metabolic and molecular bases of inherited diseases. Eds Scriver CR, Beaudet A. 2<sup>nd</sup> ed, vol 2, New York, McGraw Hill, 1995, p 2371-2384.
8. Takahara S. Acatalasemia in Japan. In Beutler E ed. Hereditary disorders of erythrocyte metabolism. New York, Grane and Shratton, 1968 p 21-40.
9. Aebi H, Wiss SR. Acatalasemia. In the metabolic basis of inherited diseases. Stanbury JB, Wingaarden JB, Frederickson DS eds, 4<sup>th</sup> ed, New York, McGraw Hill 1977, p 1972-1807.
10. Ogata M. Acatalasemia. Hum Genet 1991: 86: 331-340.
11. Góth L. A new type of inherited catalase deficiencies: Its characterization and comparison to the Japanese and Swiss type of acatalasemia. Blood Cells Mol Dis 2001: 27: 512-517. [\[31\]](#)
12. Góth L, Rass P, Pay A. Catalase enzyme mutations and their association with diseases. Mol Gen 2004: 8:141-149. [\[46\]](#)
13. Góth L. A kataláz enzim klinikai vonatkozásai és mutációi Magyarországon. Lege Artis Medicinae 2005: 15: 274-278. [\[4\]](#)
14. Hamada Y, Kameyama Y, Iizuka T, Ishizaki T, Nishiyama T, Isshiki A. Methemoglobinemia from hydrogen peroxide in a patient with acatalasemia. Anesthesiology 2004: 101: 247-248 (case report).
15. Matsunaga T, Seger R, Höger L, Tiefenaur L, Hotzig WH. Congenital acatalasemia. A study of neutrophil function after provocation with hydrogen peroxide. Pediatr Res 1985: 19: 1187-1190.
16. Aebi H, Heiniger JP, Büttler R, Hassig A. Two cases of acatalasemia in Switzerland. Experientia 1961: 17: 466.
17. Wen JK, Osumi T, Hashimoto T. Molecular analysis of human acatalasemia: Identification of a splicing mutation. J Mol Biol. 1990: 211: 383-393.
18. Hirono A, Sasaya-Hamada F, Kanno H, Fujji H, Yashida T, Miwa S. A novel human catalase mutation (358T-del) causing Japanese-type acatalasemia. Blood Cells Mol Dis 1995: 21: 232-234.
19. Crawford DR, Mirault ME, Moret R, Zbinden I, Cerutti PA. Molecular defect in human acatalasia. Biochem Biophys Res Comm 1988: 153: 59-66.



20. Parboosingh JS, Rousseau M, Rogan F, Amit Z, Chertkov H, Jofnson WG, Manganaron F, Scipper HN, Curran TJ, Stossel J, Rouleau GA. Absence of mutations in superoxide dismutase and catalase in patients with Parkinson's disease. Arch Neurol 1995; 52: 1160-1163.
21. Wally V, Buchroithner B, Klausegger A, Laimer M, Hintner H, Bauer JW. Acatlasemia: identification and characterization of a novel missense mutation. J Invest Dermatol 2004; 122: A85-A85 506.(Meeting Abstract).

## **2. 2. 5. Kataláz enzim vizsgálatok a diagnosztikában**

### **2. 2. 5. 1. Szérum kataláz**

Ma már jól ismert, hogy a szérumban a kataláz enzim aktivitása mintegy 1666-od része (56,7 kU/l vs  $94,5 \times 10^3$  kU/l) a vér kataláz aktivitásának [1]. Hasonló az arány a szérum és a májszövet kataláz aktivitása között is [2]. Ezek és a korai kataláz meghatározási módszerek érzékenysége alapján nyilvánvaló, hogy a vér és a máj kataláz tartalmát bizonyítottan tekintették és vizsgálták különböző patológiás körülmények között már a múlt század első éveiben [3].

A szérumban a kataláz jelenlétét több szerző sem tudta kimutatni, ami az általuk használt kevésbé érzékeny mérési módszernek volt tulajdonítható. Ezért az 1930-as évekig az a felfogás volt az elfogadott, hogy a szérumban nincs kataláz.

Kurokova [4] és Takizawa [5] munkássága 1930-ban és 1931-ben egyértelműen bizonyította a szérumban/plazmában a kataláz enzim jelenlétét és meghatározhatóságát.

Ezen munkák inspiráltak sok közleményt a kataláz enzim diagnosztikai jelentőségéről, amikor más diagnosztikai jelentőségű enzim aktivitás mérésről még csak néhány közlemény jelent meg (diasztáz, alkalikus foszfatáz).

A szérum kataláz aktivitást acute pancreatitisben már az 1950-es évek elején tanulmányozták [3].

Umeda 1953-ban leírta a szérum kataláz aktivitás emelkedését pancreas betegségekben és köztük acute pancreatitisben [6]. Ezeket az eredményeket erősítette meg teljesen Tsukiyama [7] 1961-ben és részben Gülzow [8] 1967-ben.

Dille és Watkins [9] 1948-ban és Yamagata [10] 1953-ban már beszámoltak a szérum kataláz emelkedéséről hemolitikus megbetegedésekben, amit későbbi szerzők csak részben erősítettek meg [11-13].

### **2. 2. 5. 2. Korábbi szérum kataláz vizsgálataim**

A polarográfiás szérum kataláz aktivitás klinikai diagnosztikai alkalmazhatóságának vizsgálatokor 1969-ben az egyik mintánál nagyon magas

kataláz aktivitást mértem. A beteg a sebészeti osztályon feküdt acute hasi problémával és a további laboratóriumi eredmények (amiláz, lipáz) segítettek az acute pancreatitis diagnózisának felállításában. Ez az eset és az irodalom tanulmányozása irányította figyelmünket (Laboratórium, Belgyógyászat és Sebészet osztályok kooperációja) a jelenségre és kezdtük vizsgálni a szérumban kataláz jelentőségét acute pancreatitisben. Erről a témáról több közleményünk [14-19] számoltunk be.

A vörösvértestek magas és a szérumban alacsony kataláz aktivitása, valamint az a tény, hogy vörösvértestek destrukciója során a kataláz közvetlenül a plazmába kerül, sugallják a kataláz meghatározás diagnosztikai alkalmazhatóságát az ilyen típusú elváltozásokban.

A szérumban kataláz aktivitás növekedését a detektáltuk a következő hemolízissel járó folyamatokban: anemia pernicioza, Zieve syndromában, polyglobulia/polycytemia vera, hemolitikus anemia. A szérumban kataláz csökkenését találtuk a nem hemolitikus anemiákban [20].

Elsőként találtuk szérumban kataláz aktivitás növekedést a következő megbetegedésekben.

Acute myocardialis infarctusban [21] kismértékű szérumban kataláz enzim aktivitás növekedést ( $96,6 \pm 58,9$  kU/l, n: 221 vs  $56,7 \pm 21,3$  kU/l, n: 111,  $p < 0,001$ ) detektáltuk, amely a maximumát a 2. napon érte el ( $137,6 \pm 67,8$  kU/l) és a 4. napra tért vissza a referens tartományba. Az infarctusban exitáltak átlagos szérumban kataláz szignifikánsan ( $p < 0,001$ ) magasabb volt, mint a túlélőké ( $112,9 \pm 54,6$  kU/l, n: 91 vs  $96,4 \pm 58,9$  kU/l, n: 221).

A szív eredetű keringési elégtelenségben [22] kialakuló oxigénhiányra a máj, a vese és az agy a legérzékenyebb. A máj hypoxiája annak pangásához, illetve enzimeinek a keringésbe való jutását eredményezi. A máj enzimek közül ezen céllal vizsgálták a GOT, GPT, LDH és GLDH enzimek aktivitását, míg a kataláz enzim vizsgálatát mi végeztük elsőként. Kisvérköri pangásban a szervezet a tartós oxigénhiány csökkentésére a kompenzációs mechanizmusban fokozott vörösvértest képzéssel (poliglobulia) reagál. Ennek eredményeként nő a vörösvértest enzimek (LDH, aldoláz, fruktózdifoszfát, malát dehidrogenáz) szérumban aktivitása. 111 nagyvérköri pangásban szenvedő betegnél a kataláz enzim aktivitás a 3,87-szeresére ( $219,1 \pm 85,0$  vs  $56,7 \pm 21,3$ ) növekedett. Ennél nagyobb mértékben növekedett a GOT (9,9-szeres), a GPT (9,8-szeres) és legnagyobb mértékben a mitokondriális lokalizációjú GLDH (18,2-szeres). A terápia (szív) eredményessége esetén a máj enzimek, köztük a kataláz is napokon belül visszatér a referens tartományba. 52 kisvérköri pangásban szenvedő betegnél is emelkedett a szérumban kataláz ( $191,3 \pm 59,1$  kU/l vs  $56,7 \pm 21,3$  kU/l), ami a vörösvértestszám szignifikáns emelkedésével ( $4,74 \pm 0,69$  vs  $4,36 \pm 0,26$ ) járt együtt. A keringési elégtelenség két formája közül a kompenzált (n: 260) kismértékű ( $69,3 \pm 23,3$  kU/l vs  $56,7 \pm 21,3$  kU/l), míg a dekompenzált

forma (n: 186) jelentős ( $111,2 \pm 62,5$  kU/l vs  $56,7 \pm 21,3$  kU/l) szérumban katalázaktivitás növekedést mutatott.

Az ipar, a mezőgazdaság, a gyógyszergyártás fejlődése [23] egyre több új vegyületet produkál, amelyek a sok előnyös tulajdonságuk mellett a szervezetre gyakorolt mérgező hatásuknak tulajdoníthatóan potenciális toxikus veszélyt jelenthetnek. Az átlagos szérumban katalázaktivitás növekedés a legkisebb volt a gyógyszerintoxikációknál:  $73,1 \pm 30,4$  kU/l, (n: 232), magasabb volt az alkoholos intoxikációkban:  $106,1 \pm 48,2$  kU/L (n: 96) és a legjobban emelkedett a különböző vegyszerek által okozott intoxikációknál:  $116,8 \pm 80,5$ , (n: 99). A gyógyszermérgezések között 79,7% volt az öngyilkossági szándék és betegek közül 3-an (0,43%) exitáltak. A vegyszerrel történő mérgezéseknél az öngyilkossági szándék 46,3% volt és 23 betegnél (23,2%) volt halálos kimenetelű. A legtöbb mérgezés (40, azaz 40%) a következő növényvédőszerrel történt. Parakvát (Gramoxone) mérgezésben 16 beteg, ebből 10 beteg exitált (71,4%), míg szerves foszforsavészterek (Bi 58, Diklórfosz, Fibol E) 24 esetben okoztak intoxikációt és ebből a csoportból 10 (38,4%) beteg exitált. Az öngyilkossági szándék a parakvát mérgezéseknél 50%, a szerves foszforsavésztereknél 80,7% volt, míg a többi esetben véletlennek tulajdonítható az intoxikáció. A betegek halálát a kezdeti akut szak utáni napokban a heveny keringési elégtelenség, tüdőfibrosis, vese-, máj- és szívelégtelenség okozta. A szérumban katalázaktivitás növekedés főként a kialakult májelégtelenségnek tulajdonítható.

### 2. 2. 5. 3. Vér kataláz

A vér, illetve vörösvértestek magas kataláz tartalma, a hidrogénperoxid szubsztrát elérhetősége illetve a kataláz reakcióban keletkező oxigén detektálásának lehetősége már az 1800-as évek közepétől lehetővé tette a vér kataláz diagnosztikai jellegű vizsgálatát [3].

Schönbein [24] már 1863-ban megfigyelte, hogy a vér bontja a hidrogénperoxidot. Ezt a jelenséget Bergergrün [25] 1888-ban a vörösvértesteknek tulajdonította.

A vér katalázaktivitást klinikai céllal először Gottstein [26] vizsgálta 1893-ban különböző (anémia, diabetes, nephritis) betegségekben, bár vizsgálatainak még változást nem mutattak ezekben az állapotokban.

Jolles és Oppenheim [26] 1905-ben már 100 egyén vizsgálatának alapján referenciaértéket állapított meg. Ehhez az értékhez viszonyítva csökkent katalázaktivitást találtak tuberculosishoz, tumorokban, chronicus nephritisben, icterushoz és a leukémia egyes eseteiben.

Magyar kutatókat is találtam a korai katalázvizsgálók között. Dalmady és Torday [2] 1907-ben úgy vélték, hogy a vér katalázaktivitása azokban a betegségekben

csökken, amelyek súlyos anemiával társulnak. Ezen logikus megfigyelést később sokan megerősítették.

Az első részletes 'normál' értéket is magába foglaló és az ehhez történő viszonyítást alkalmazó közlemény szerzői Winternitz és munkatársai [2]. Ezen szerzők a vér kataláz vizsgálatnak diagnosztikai szerepet tulajdonítottak fertőző betegségekben, sárgaságban, vese- és szívelégtelenségben, terhességi anemiában és egyes hematologiai megbetegedésekben.

## Irodalom

1. Góth L. Eljárás a vérkonzervek hemolízisének meghatározására. *Transfusio* 1977: 18:124-128.
2. Góth L. Determination of catalase enzyme activity in human tissues by programmable polarograph. *Hungarain Scientific Instruments* 1983: 53: 43-46.
3. Góth L. Az enzimdiagnosztika egyik legkorábbi enzime, a kataláz. *Orvosi Hetilap* 1992: 133: 499-500. [1]
4. Kurokawa H. *Tohoku J Exp Med* 1930: 14: 520.
5. Takizawa Y. *Tohoku J Exp Med* 1931: 18: 223 és 239.
6. Umeda M. Studies on the catalase in pancreatic disorders. *Med J Osaka Univ* 1953: 50: 24
7. Tsukiyama Y, Kubota Í, Misumi T, Fukuda H, Nakayama M. Studies on serum catalase in pancreatic disorders. *Med J Osaka Univ* 1961: 12: 105-135.
8. Gülzow M, Möller G. Die Serumkatalase bei acuter Pankreatitis. *Dtsch Z Verdau Stoffwechselkr* 1967: 25: 176-183.
9. Dille RS, Watkins CH. Plasma catalase in hemolytic diseases and other abnormal states. *J Lab Clin Med* 1948: 33: 487.
10. Yamagata S, Seino S. Studies on blood and plasma catalase. *Tohoku J Ex Med* 1953: 57: 101.
11. Kirsch W, Burmeister W. Bestimmung der Serum-und Plasmakatalase beim Menschen unter verschiedenen physiologischen und pathologischen Bedingungen. *Arch Kinderheilk* 1966: 174: 153-161.
12. Heller H. Bedeutung der Katalase für die Praxis. *Med Welt* 1969:45: 487-496.
13. Giannitsis DJ, Panagopoulos DA, Timerman A. Störungen der Katalase des Serums bei verschiedenen pathologischen Zuständen des Menschen. *Enzymologia* 1972: 42: 355-361.
14. Mészáros I, Góth L, Vattay G. The value of serum catalase activity in acute pancreatitis. *Am J Dig Dis* 1973: 18: 1035-1040.
15. Góth L, Mészáros I, Németh H. Serum catalase enzyme activity in acute pancreatitis. *Clin Chem* 1982: 28: 1999-2000.
16. Mészáros I, Ládics O, Czehelnik R, Góth L, Németh H, Tóth A. Hiperlipémiával együtt észlelt akut pancreatitis. *Orvosi Hetilap* 1982: 123: 2649-2653.
17. Góth L. A szérum kataláz enzim aktivitásának jelentősége az akut pankreatitisz diagnosztikájában. *Laboratóriumi Diagnosztika* 1984: 11: 132-133.
18. Góth L. Origin of serum catalase activity in acute pancreatitis. *Clin Chim Acta* 1989: 186: 39-44. [17]
19. Góth L. A kataláz enzim és a pancreatitis acuta. *Orvosi Hetilap* 1997: 138: 825. [19]
20. Góth L, Német H, Mészáros I. Serum catalase activity for detection of hemolytic disease. *Clin Chem* 1983: 29:741-742.
21. Góth L, Német H, Mészáros I. A szérum kataláz enzim aktivitásának változása

- szívinfartusban. Laboratóriumi Diagnosztika 1982: 9: 99-101.
22. Góth L. A szérumbkataláz enzim aktivitásának vizsgálata szíveredetű keringési elégtelenségben. Magyar Belorvosi Archívum 1983: 36: 39-46
  23. Góth L, Mészáros I, Németh H. A szérumbkataláz enzim aktivitásának változása mérgezésekben. Egészségtudomány 1982: 27: 149-154.
  24. Schönbein CF. J prakt Chemie 1863: 89: 323.
  25. Bergergrün. Inaug Diss. Dorpat 1888.
  26. Gottstein: Virchow's Arch f path Anat 1893: 133: 30.
  27. Jolles Oppenheim. Virchow's Arch f path Anat 1905: 180: 185.
  28. Dalmady Z, Torday A. Wien Klin Wschr 1907: 20: 457.
  29. Winternitz MC, Henry GR, McPhedran F. Arc Int Med 1911: 7: 624.

## 2. 2. 6. Kataláz aktivitás meghatározási módszerek

A kataláz enzim által katalizált reakció a következő:



Az enzim aktivitás mérése kivitelezhető a keletkező oxigén vagy a reagált szubsztrát koncentrációja csökkenésének mérésével, manuális eljárásokkal, valamint műszeres módszerekkel.

### 2. 2. 6. 1. Kataláz aktivitás meghatározás a keletkező oxigén mérésével

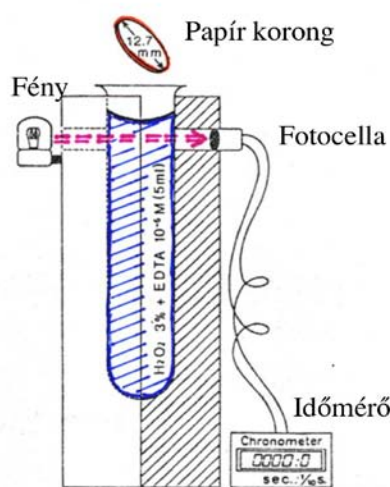
A reakcióban keletkező oxigén mérése a térfogat mérési eljárással félkvantitatívan már az 1800-as években lehetséges volt. Ezt használta Thenard [1] is kísérleteiben és több más kutató a múlt század fordulóján [2-4]. Thenard egy beosztással és Hg zárófolyadékkal ellátott csövet használt az oxigén térfogatának mérésére. Ezt az eszközt többen módosították és egy másik szerző, például Westgreen pipettába szívta fel a vér és szubsztrát keveréket és a cső beosztását használta az oxigén térfogatának mérésére [5]. Takahara, aki a veleszületett katalázhiányt elsőként írta le, a következő szűrőteszttel kezdte vizsgálatait. A fülcimpából vett vércsepphez egy csepp hidrogénperoxidot adott és figyelte az oxigén buborékok képződését [6].

A keletkező oxigén detektálásával történő kataláz mérésre dolgozta ki Gagnon M [7] a korong (disc) flotációs módszert. Ennek lényege, hogy egy csőben, amelyben a szubsztrát hidrogénperoxid van, a vizsgálati mintába mártott szűrőpapír korongot helyeznek. Ez a korong a cső aljára süllyed, majd a reakcióban keletkező és a korong alján gyülekező oxigén buborékok a felszínre fogják emelni. A szerző ezen mérőmódszerhez egy készüléket szerkesztett, amelyben a flotációs időt (azon idő, amely alatt a korong a felszínre emelkedik) fotocellával detektálva mérte. A flotációs idő logaritmusa a minta kataláz aktivitásával volt arányos. A készüléket mikrobiológiai alkalmazásra tervezték és a kataláz 'próba' kivitelezésére szolgált, de használták a vizelet kataláz tartalmazó baktériumainak kimutatására is. A készülék a CATALASEMETER

nevet kapta és 1977-ben az USA-ban, majd 1978-ban Kanadában szabadalmaztatták. A Catalasemeter és a spektrofotometriás hidrogénperoxid meghatározáson alapuló kataláz mérési módszerek hasonló eredményeket adtak [8].

Az ábrán felül a mintával telített korong, a készülékben a szubsztrát, alul a számláló szerkezet és felül a fotocellás detektor, amely leállítja a számlálót, amikor a felszálló korong a fényútba ér.

A reakcióban keletkező oxigén folyamatos detektálását és ez alapján a kataláz aktivitás mérését Rigo és Rotilio a Clark-féle oxigén elektród alkalmazásával végezte [9].



A CATALASEMETER sematikus ábrája.

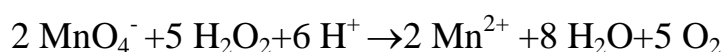
## 2. 2. 6. 2. Kataláz aktivitás meghatározás a hidrogénperoxid mérésével

A kataláz meghatározási módszerek második csoportja a hidrogénperoxid szubsztrát koncentráció csökkenést méri.

### 2. 2. 6. 2. 1. Titrimetriás eljárások

A korábbi, manuális módszerek a hidrogénperoxidot titrálással határozták meg.

A permanganometriás hidrogénperoxid meghatározás reakció egyenlete:



Ezzel a titrálással határozta meg a szubsztrátot már 1903-ban Senter [10]. Ezt módszert a századforduló elején széleskörben alkalmazták, köztük Bach és

Zubkova is [11]. Feinstein is ezt a titrálást alkalmazta, de ő hidrogénperoxid szubsztrátot a stabilabb nátrium-perboráttal helyettesítette [12].

Chance és mtsai az enzimkinetikát tanulmányozták ezzel a módszerrel [13]. Egy kisebb készüléket fejlesztettek ki (Rapid Flow Injection), amellyel az enzimatis reakciót tetszőleges időben le tudták állítani és ezután titrálással határozták meg a szubsztrát fogyást [14].

A jodometriás eljárásnál a hidrogénperoxidot feleslegben lévő KJ-al reagáltatják és a keletkező jódot nátrium-tioszulfáttal titrálva határozható meg a minta hidrogénperoxid koncentrációja. Ezt az eljárást már Jolles 1903-ban alkalmazta. [15]. A módszer további alkalmazói/fejlesztői közül Dill [16] és Yamagata [17] emelendő ki, akik az eljárást klinikai diagnosztikai céllal alkalmazták.

## 2. 2. 6. 2. 2. Műszeres eljárások

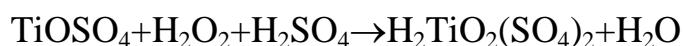
A műszeres analitikai hidrogénperoxid mérések spektrofotometriát, fluorimetriát és polarográfiát alkalmaznak.

A spektrofotometriás eljárások egy része a hidrogénperoxid UV tartományú abszorpciós maximumánál történő közvetlen mérést, míg a többiek a szubsztrát és valamilyen színeképző által létrehozott szín intenzitását mérik.

A közvetlen mérési módnál 230 nm-nél mérik a hidrogénperoxid abszorbanciáját. A módszer gyors, specifikus és nem igényel reagenst. Ezzel magyarázható ennek az eljárásnak a széleskörű [18, 19] használata, főként a kutatói területe és tiszta vagy tisztított kataláz tartalmú minták esetén. Szérum, vér hemolizátumok, szövet homogenizátumok esetén a módszer alkalmazhatósága erősen korlátozott ezen minták magas fehérje/lipid tartalma miatt, amelyek a kiindulási abszorbanciát nagyon nagy mértékben növelik.

A közvetett hidrogénperoxid meghatározási eljárások több színeképzővel is dolgoznak.

A következő reakcióban keletkező  $\text{H}_2\text{TiO}_2(\text{SO}_4)_2$  sárga színű és abszorbanciája a 410 nm-es abszorpciós csúcsonál mérhető [20].



A kataláz enzim 'peroxidatív hatását' használja fel Johansson [21] eljárása, amelyben hidrogénperoxid és metanol a szubsztrát. A reakcióban keletkező formaldehiddel képeznek 540 nm-nél mérhető színes vegyületet.

További színeképzőként alkalmazták a  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ -et [22], amelyeket a hidrogénperoxid oxidál színes vegyületté és az o-tolidint [23], amelyet a peroxidáz enzim hidrogénperoxid jelenlétében színes o-tolidinné alakít. Egyes esetekben az o-tolidint o-dianizidin helyettesíti.

A fotometriás eljárások közé tartozik a fluorimetriás hidrogénperoxid meghatározás [24], amelyet a Nature-ban közöltek 1961-ben kataláz aktivitás mérésre. Napjainkban a Fenton reakció inhibíciójának mérésekor, a szubsztrát csökkenése a kataláz hatása révén, a quinolin hidroxilizáció fluoreszcenciájának csökkenését detektálják [25].

Az elektrokémiai eljárásokat is sikerrel alkalmazták a kataláz aktivitás méréshez. A polarográfiában az alapoldat oxigén redukciós lépcsőjének mérése már a polarográfia eljárás első analitikai alkalmazása óta ismert és a specifikus hidrogénperoxid mérés révén szívesen alkalmazták [26-28] a kataláz méréseknél. Újabban a bioassay-ben is alkalmazást nyert kataláz aktivitás mérésre [29].

A kataláz enzim mérésére ismertek immunkémiai eljárások, amelyeket főként a korábbi években alkalmaztak [30,31].

Automata analizátorra is dolgoztak ki kataláz aktivitási eljárásokat. A korai alkalmazásra példa a már ismertetett  $\text{H}_2\text{TiO}_2(\text{SO}_4)_2$ , színreakciót alkalmazó eljárás [20].

Yasmineh WG és mtsai a COBAS centrifugális analizátorra fejlesztették ki kataláz meghatározási módszerüket [32]. A kataláz kis mértékben katalizálja a hidrogénperoxid és etanol reakcióját. A keletkező acetaldehidet  $\text{NADP}^+$  és aldehid-dehidrogenáz segítségével ecetsavvá és  $\text{NADPH}$ -vá alakították és a  $\text{NADPH}$  abszorbanciáját mérték 340 nm-nél.

Slaughter és O'Brien bármely nyitott analizátorra alkalmazható automatizált eljárást dolgozott ki [33]. Eljárásában a húgysav urikáz enzimmel történő bontása során keletkező hidrogénperoxid szolgál a kataláz enzim szubsztrátjaként. A kataláz enzim által el nem bontott hidrogénperoxid a Trinder reakcióban a peroxidáz enzim segítségével kerül meghatározásra. A szerzők 5 közleményemet használtak fel az eljárás kialakításánál.

Japán nyelven is jelent meg automatizált kataláz mérési módszer, amelyről részletesebben a szérum kataláz részben található információ.

Mikrolemezen kivitelezhető, automatizált eljárást közölt Cohen, aki a hidrogénperoxid,  $\text{Fe}^{2+}$  és tiocianát reakciójában képződő színes terméket határozza meg mikrolemezen történő leolvasás után [34].

A legújabb fluoreszcenciás és kemilumineszcenciás hidrogénperoxid meghatározások főként a plazmában, sejtekben, szövetekben lévő alacsony hidrogénperoxid koncentrációjának mérésére használatosak.

Ou és Wolf [35] eljárása a FOX assay-t alkalmazza, amelynek lényege a hidrogénperoxid által történő vas oxidáció xylene orange-ban (Ferrous Oxidation in Xylenol Orange) és a keletkezett szín abszorbanciáját 560 nm-nél mérik.

A luminol (5-amino-2, 3 dihidro-1, 4-ftalazindion), a  $\text{NaOCl}$  reakciója során a kemilumineszcencia a hidrogénperoxid koncentráció függvénye és így felhasználható a kataláz aktivitásának mérésére [36].

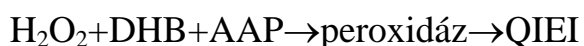


Az eurórium (III)-teraciklin derivátum–hidrogénperoxid komplex fluoreszcenciája a hidrogénperoxid koncentráció csökkenésével arányosan változik. Ez a mérési elv kinetikusan és végpontosan is kivitelezhető [37].

Kereskedelmi forgalomban meglehetősen szerény a kínálat kataláz tesztekből. Ennek okai lehetnek: a szubsztrát labilis, folyadék formája, korrozív és robbanékony volta, az UV tartományban történő detektálás problémái, amikor kataláz tartalmú biológiai mintát vizsgálnak és nem tisztított kataláz készítményt, kataláz kalibrátor hiánya és saját készítésű reagensek olcsósága.

A SIGMA gyártmányú, főként kutatói felhasználásra alkalmas kataláz aktivitás mérési teszt volt forgalomban, de ennek gyártását már több éve beszüntették, azután újra forgalmazni kezdték 2005-ben.

Legújabbban az OxisResearch készített és forgalmaz kutatási célra kataláz kitet [38]. A szubsztrát 10  $\mu\text{mol/ml}$  hidrogénperoxid, amit tömény 30%-os hidrogénperoxidból kell hígítani foszfát pufferral naponta. Az eljárás során a kataláz a hidrogénperoxidot bontja az első lépésben, majd a kataláz reakciót Na-aziddal leállítják és a maradék hidrogénperoxidot egy kapcsolt reakcióban spektrofotometriásan határozzák meg.



DHB: 3,5-Dichloro-2-hydroxybenzenesulfanic acid, AAP: 4-aminophenazone

QIEI: Quinineimine színezék, amelynek abszorbanciája 520 nm-nél mérhető. A mérés előtt kalibrációt kell végezni és a kalibrációs görbét egy másodfokú egyenlet definiálja. A mérési tartomány 2-80 U/ml vagyis 2-80 kU/l.

Az újonnan kifejlesztett kit eredményeiről még nincs megfelelően értékelhető tapasztalat az irodalomban.

A Japánban kifejlesztett, japán nyelven közölt és Japánban alkalmazott automata szérumban kataláz meghatározásról az irodalom megemlékezik [39].

### **2. 2. 6. 2. 3. Kataláz aktivitás mérési módszereim**

Az 1960-as évek végén, amikor elhatároztuk, hogy a kataláz enzim klinikai és klinikai kémiai vonatkozásaival foglalkozunk, el kellett döntenünk, hogy milyen meghatározási módszert alkalmazunk. Ezekben az években az enzimdiagnosztika volt a klinikai kémia legdinamikusabban fejlődő ága. Sorozatban jelentek meg a közlemények a szérumban mérhető enzimek meghatározási módszereiről és klinikai alkalmazhatóságukról.

Ennek az időszaknak további jellemzője volt, hogy főként a sorozatban végzett rutin laboratóriumi eljárásoknál a műszeres méréshez a laboratóriumok a spektrofotometriás eszközökön túlmenően elektrokémiai analitikai műszerekkel is rendelkeztek (polarográf, potenciométer, konduktométer, coulombmérő).

Mi ebből a repertoárból 1968-ban a polarográfiát választottuk a kataláz enzim hidrogénperoxid szubsztrátjának mérésére. Döntésünket indokolta, hogy a polarográfiás hidrogénperoxid meghatározás specifikus még olyan komplex minták esetén is, mint a vér és a szérum, a mérés nem igényel reagenst, ezért olcsó, a szérumból történő spektrofotometriás méréseknél ismert interferenciák (hemolízis, lipémia, icterus) a polarográfiás mérést nem befolyásolják. A mérési idő, pontosság (sorozaton belül és sorozatok között) azonos a spektrofotometriás meghatározásokéval.

A munka során optimalizáltam: a hőmérsékletet, pH-t, mérési tartományt, szubsztrát koncentrációt, reakcióidőt, enzim aktivitás leállítását és a polarográfiás mérés paramétereit.

Az optimális reakciókörülmények között történő hidrogénperoxid bontást 60 sec után 3-amino-1, 2, 4-triazollal (kataláz inhibítor) leállítottam és polarográffal mértem a maradék hidrogénperoxid koncentrációját [40-42].

A polarográfiás szérum kataláz meghatározás értékeléséhez több alkalommal is végeztem referencia tartomány meghatározást [40-43].

Ezzel a módszerrel vizsgáltam a szérum kataláz változását a következő betegségekben: acute pancreatitis, hemolízissel járó megbetegedések, acute myocardialis infarctus, máj- és epebetegségek, szív eredetű keringési elégtelenség, különböző típusú intoxikációk [44].

A polarográfiás módszer jól alkalmazható volt különleges minták esetén is:

- a. hemolizált minták mérése a vérkonzervek stabilitásának vizsgálatakor [43],
- b. az erősen lipémiás szérum mintáknál, például acute pancreatitisben szinte ez volt az egyetlen mérhető paraméter, amely a diagnosist segítette [45-47],
- c. erősen icterusos szérum mintáknál máj és epebetegségekben szintén probléma nélkül alkalmazható volt.
- d. a turbid szervhomogenizátumok vizsgálata is elvégezhető volt ezzel az eljárással a minták különösebb kezelése nélkül [48,49].

A polarográfiás módszert a spektrofotometriás eljárás váltotta fel 1991-től [50].

## Irodalom

1. Thenard J. Ann Chim Phys 1819: 9: 54.
2. Spitzer W. Arcg Geol Phys 1897: 67: 615.
3. Cotton S. Bull Soc Chim France 1901: 25: 255.
4. Neidig RE. J Am Chem Soc 1914: 36: 417.
5. Mizuno H. Med J 1962: 1: 65.
6. Takahara S. Progressive oral gangrene probably due to lack of catalase in the blood (acatalasemia). Lancet 1952: 1101-1104.
7. Gagnon M, Muntig WM, Esselen B. Anal Chem 1959: 31: 144.
8. Boismenu D, Lepine F, Gagnon M, Dugas H. Catalase activity measurement with the disc flotation method. Anal Biochem 1989: 178: 404-407.

9. Rigo A, Rotilio G. Simultaneous determination of superoxide-dismutase and catalase in biological materials by polarography. *Anal Biochem* 1977; 81: 157-166.
10. Senter C. *Z Physik Chem* 1903; 44: 257.
11. Bach A, Zubkova S. *Biochem Z* 1921; 125: 263.
12. Feinstein RN. *J Biol Chem* 1949; 180: 1197.
13. Chance B. *Acta Chem Scand* 1947; 1: 610.
14. Bonnischsen RK, Chance B. Theorell H. *Acta Chem Scand* 1947; 1: 685.
15. Jolles A. *Z Biol* 1903; 45: 248.
16. Dill RS, Watkins CH. *J Lab Clin Med* 1948; 35, 480, 487.
17. Yamagat S, Seino T. *Tohoku J Exp Med* 1953; 57: 85.
18. Beers S, Seizer IW. *J Biol Chem* 1952; 195: 133.
19. Bergmeyer HU. *Biochem Z* 1955; 327: 255.
20. Lamy JN, Lamy J, Provansal J, deHusse, Weili JD. *Bull Soc Chim Biol* 1967; 49: 1167.
21. Johansson LH, Borg LAH. A spectrophotometric method for determination of catalase activity in small tissue samples. *Anal Biochem* 1988; 174: 331-336.
22. Sinka AK. *Anal Biochem* 1972; 47: 389.
23. Rosen EA. *Ger Offen* 2, 407, 046. 1974.
24. Perschke H, Broda E. *Nature* 1961; 190: 257.
25. Mao YX, Zheng H, Guo XQ, Chen R, Zheng WY, Studies on the fluorometric method for determining activity of catalase and its application to marine biosamples. *Chem J Chinese Univ* 2002; 23: 1864-1867.
26. Brdicka R, Tropp C. *Biochem Z* 1937; 289: 301.
27. Walker BS. *Fed Am Chem Soc Exper Biol Procl* 1941; 1:140.
28. Molland J. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1947; 1: S.66.
29. Carpentier R, Goetze DC. Microelectrochemical cell containing chloroplast membranes as a fast bioassay for catalase determination. *Anal Chim Acta* 1993; 281: 335-339.
30. Higashi T, Yagi M, Hirai H. Immunochemical studies on catalase. 1. Assay of catalase in erythrocytes and liver. *J Biochem* 1961; 49: 707-712.
31. Ben-Yoseph Y, Shapira E. Specific immunoassay for quantitative determination of human erythrocyte catalase. *J Lab Clin Methods* 1973; 81: 133-139.
32. Yasmineh WG, Chung MY, Caspers JI. Determination of serum catalase activity on a centrifugal analyzer by an NADP NADPH coupled enzyme reaction. *Clin Biochem* 1992; 25: 21-27.
33. Slaughter MR, O'Brien PJ. Fully-automated spectrophotometric method for measurement of antioxidant activity of catalase. *Clin Biochem* 2000; 33: 525-534.
34. Cohen G, Kim M, Ogwa V. A modified catalase assay for a plate reader and for the analysis of brain cell cultures. *J Neurosci Methods* 1996; 67: 53-56.
35. Ou PM, Wolf SP. A discontinuous method for catalase determination at 'near physiological' concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and its application to the study of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> within cells. *J Biochem Biophys Meths* 1996; 31: 59-67.
36. Mueller S, Riedel HD, Stremmel W. Determination of catalase activity at physiological hydrogen peroxide concentrations. *Anal Biochem* 1997; 245: 55-60.
37. Wu M, Lin Z, Wolfbeis OS. Determination of the activity of catalase using a europium (III)- tetracycline-derived fluorescent substrate. *Anal Biochem* 2003; 320: 129-135.
38. BIOXYTECH® Catalase-520™ -Spectrophotometric assay for catalase. For research use only. Not for use in diagnostic procedures. OXIS International Inc, Portland, Oregon, USA.
39. Iwamura J, Tanaka H, Takeuchi M, Hosotsubo H. Quantitative analysis of catalase activity in human serum (in Japanese). *J Med Technol* 1991; 35:1347-1350. és 1993; 37: 87-90.
40. Góth L. Humán vérszérum kataláz enzim aktivitásának meghatározása. Műszaki doktori értekezés. Sümeg-Veszprém 1971.

41. Góth L, Mészáros I. Polarographic determination of serum catalase activity. *Hungarian Scientific Instruments* 1975; 32: 13-16.
42. Góth L. Szérum kataláz enzim aktivitás meghatározás programozható polarográfival. *Kórház és Orvostechnika* 1982; 20: 6-9.
43. Góth L, Németh H, Mészáros I. Eljárás vérkonzervek hemolízisének meghatározására. *Transfusio* 1977; 10: 124-128.
44. Góth L. A szérum kataláz enzim aktivitásának meghatározása, diagnosztikai használhatósága és klinikai kémiai jellemzése. MTA. Kandidátusi értekezés. 1984.
45. Mészáros I, Góth L, Vattay G. The value of serum catalase activity determination in acute pancreatitis. *Am J Dig Dis* 1973; 16: 1035-1043.
46. Góth L, Mészáros I, Németh H. Serum catalase enzyme activity in acute pancreatitis *Clin Chem* 1982; 28: 1999-2000.
47. Mészáros I, Ládics O, Czehelnik R, Góth L, Németh H, Tóth A. Hiperlipémiával együtt észlelt akut pancreatitis. *Orvosi Hetilap* 1982; 123: 2649-2653.
48. Góth L. Determination of catalase enzyme activity in human tissues by programmable polarograph. *Hungarian Scientific Instruments* 1982; 53: 43-46.
49. Góth L. A human szérum kataláz enzim elektroforetikus tulajdonságának vizsgálata. *Kísérletes Orvostudomány* 1983; 35: 402-407.
50. Góth L. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clin Chim Acta* 1991; 196: 143-152. [22]

### **3. CÉLKITŰZÉSEK**

Az értekezés az 1984-ben készített, a szérum kataláz vizsgálatával foglalkozó kandidátusi értekezésem folytatása. Az értekezést az alábbi szempontok alapján állítottam össze, és elvégeztem a korábbi eredményeim értékelését az újabb ismeretek, adatok birtokában.

#### **1. Az új irodalmi adatok összefoglalása, értékelése.**

- a. A hidrogénperoxid régről ismert toxikus és újonnan ismertté vált fiziológiás szerepének összefoglalása irodalmi adatok alapján.
- b. A hidrogénperoxid metabolizmust szabályozó kataláz enzim szerepének változása és különleges kinetikájának értelmezése a legújabb irodalmi adatok ismeretében.

#### **2. A szérum kataláz.**

- a. A szérum kataláz enzim aktivitás mérésére spektrofotometriás módszer kidolgozása, és a referens tartomány meghatározása.
- b. A szérum kataláz enzim aktivitásának vizsgálata további megbetegedésekben.
- c. A szérum kataláz aktivitás diagnosztikai specificitásának növelési lehetőségei és szerveredetének vizsgálata.

#### **3. A vér kataláz.**

- a. A vér kataláz aktivitás meghatározási módszere, a referens tartomány meghatározása, és vizsgálata különböző megbetegedésekben.
- b. Human vörösvértest kataláz tisztított formájának előállítása és jellemzése.

#### **4. A veleszületett katalázhiány Magyarországon.**

- a. A veleszületett katalázhiány Magyarországi első, előfordulása vizsgálati stratégiájának kidolgozása, és annak kivitelezése.
- b. A Magyarországi katalázhiány összehasonlítása az ismert (Japán, Svájci) akatalazémiás típusokkal.
- c. A Magyarországon detektált akatalazémia jellemzése klinikai, klinikai biokémiai módszerekkel.
- d. A Magyarországi akatalazémia jellemzése molekuláris genetikai módszerekkel.
- e. A Magyarországi akatalazémia, mint a veleszületett kataláz hiány egy új típusának összefoglaló jellemzése.

## 4. MÓDSZEREK ÉS BETEGEK

A módszerek felsorolása csoportok szerint, a csoporton belül abc sorrendben történt.

A módszerek előtti számok azt mutatják, hogy melyik közleményben történt a módszer alkalmazása.

Külön részben található a katalázra vonatkozó eljárások.

### 4. 1. KLINIKAI KÉMIAI MÓDSZEREK

#### Alfa-amiláz aktivitás

8. 10. 11. Amylase test, Phadebas, (Sweden), 37°C referens tartomány:  
70-300 U/l

#### Apolipoprotein A1

37. Immunturbidimetriás teszt, Boehringer Mannheim, (Germany), kívánatos:  
kisebb mint 1,15 g/l

#### Apolipoprotein B

37. Immunturbidimetriás teszt, Boehringer Mannheim, (Germany), kívánatos:  
nagyobb mint 1,0 g/l

#### Bilirubin

8. 9. Jendrasisk.Gróf eljárás: referens tartomány: 2-18  $\mu\text{mol/l}$

#### B<sub>12</sub> vitamin (plazma)

33. Abbott AXYM System B12 (Abbott Park, IL, USA): referens tartomány:  
180-1059 pg/ml

#### C- peptid (szérum)

28. C-pep-CTZ, RIA eljárás, CIS Bio International (Cedex, France), referens  
tartomány: 280-1320 pmol/l

#### Fólsav (plazma)

33. Abbott AXYM System Folate (Abbott Park, IL, USA): referens  
tartomány: 3,5-16,1 ng/ml

#### Fruktózamin

28. 32. 37. Fructosamine test, Roche Diagnostics (Basel Switzerland),  
referens tartomány: 0-283  $\mu\text{mol/l}$

#### Glükóz

28. 32. 37. Glükóz-oxidáz, peroxidáz módszer, Reanal, Budapest, referens  
tartomány: 3,5-6,0 mmol/l

#### GLDH aktivitás

7. 20. 21. Optimalizált monotest, 25 °C, Boehringer Mannheim (FRG),  
referens tartomány: 0-4 U/l

#### Glutation-peroxidáz (vér)

32. 35. Ransel Glutathione Peroxidase Test, Randox (Ireland, UK), referens tartomány: 139,8±16,5 U/l.

#### GOT aktivitás

7. 17. 20. 21. Optimalizált monostest, 25°C, Boehringer Mannheim (FRG), referens tartomány: 0-18 U/l

#### GPT aktivitás

7. 20. 21. Optimalizált monostest, 25°C, Boehringer Mannheim (FRG), referens tartomány: 0-22 U/l

#### Gamma-GT aktivitás

7. Optimalizált monostest, 25°C, Boehringer Mannheim (FRG), referens tartomány: 4-28 U/l

#### Haptoglobin

8. 33. 36. Turbox Haptoglobin test, immunnefelometria, Orion, (Finnland), referens tartomány: 0,30-2,15 g/l

9. 17. 20. 21. Elson EC. Am J Clin Pathol 1974: 62: 655, referens tartomány: 0,45-1,78 mg/l

#### Hemoglobin (szérum)

8. 17. 20. 21. 36. Benzidines színreakció, referens tartomány: 3,94-10,1 mg/dl.

8. 9. 17. 21. Shinawar GY, Walters MI. Am J Clin Pathol 1963: 40: 113, referens tartomány: 0-21 mg/l

#### Hemoglobin A<sub>1c</sub>

28. 32. 37. HPLC eljárás, DIAMAT, Bio-Rad (Richmond, CA, USA), referens tartomány: 4,2-6,1%

#### Homocisztein (plazma, összes)

33. HPLC módszer, HPLC reagent kit, Bio-Rad Laboratories (München, Germany), referens tartomány: 5-30 µmol/l

#### Karbamid nitrogén

9. Góth L, Mészáros I. Orvosi Hetilap 1973: 114: 634. referens tartomány: 2-9 mmol/l

#### Inzulin

28. Inzulin teszt, RIA eljárás, Izotóp Intézet, Budapest, referens tartomány: 5-32 mU/l

#### Karbonil csoport (fehérje)

Spektrofotometriás módszer DNPH (2,4-dinitro-phenilhidrazine) reagenssel, mértékegység: nmol karbonil/mg fehérje.

Dalle-Donne I, et al. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. Clin Chim Acta 2003: 329: 23-38

#### Koleszterin (összes)

37. Cholesterol CHOD-PAP Test, Boehringer Mannheim (Germany), kívánatos: kevesebb mint 5,2 mmol/l

#### Koleszterin HDL

37. HDL Cholesterol, CHOD-PAP Test, Boehringer Mannheim (Germany),



kívánatos: nagyobb mint 1,2 mmol/l

#### Koleszterin LDL

37. Számítva a Friedewald formulával, a limitáló tényezők figyelembe vételével, kívánatos: kisebb mint 3,4 mmol/l

#### Koleszterin LDL oxidative rezisztencia

37. Mikro-assay, a hem által katalizált LDL oxidáció alapján (Újhelyi L. et al. Clin Chem 1998:44: 1762—1764)

#### Kreatinin (szérum)

9. Popper H et al. Biochem Z 1937: 291: 354, referens tartomány: 35-106  $\mu$ mol/l.

#### LDH aktivitás

8. LDH teszt, Abott, 25°C, referens tartomán: 120-240 U/l

9. LDH teszt, Corax, 25°C, referens tartomány: 120-240 U/l

20. 21. 36. Optimalizált monotest, 25°C, Boehringer Mannheim (FRG), referens tartomány: 120-240 U/l

33. LDH test, 37°C, Roche-Boehringer (Mannheim, Germany), referens tartomány: 230-480 U/l

#### LDH izoenzim

8. 36. Elektroforetikus teszt, Paragon, Beckman (USA)

#### Lipáz aktivitás

10. 11. Színreakció, Haury test, Chemische Fabrik (FRG), referens tartomány: 0-45 U/l

#### Lipid peroxidáció

Malondialdehid mérése a tiobarbitursavas-reaktivitás alapján (Moore K, Robets L. Measurement of lipid peroxidation. Free Rad Res 1998: 28: 659-671)

#### Lipoprotein(a)

37. Immunturbidimetriás teszt, Boehringer Mannheim, (Germany), kívánatos: kisebb mint 300 mg/l

#### Methemalbumin

8.9. Bánki F. Kandidátusi értekezés. SOTE, MTA, 1973

#### Transzferrin

36. Turbox Transferring Test, immunefelometria, Orion, (Finland), referens tartomány: 2,0-4,0 g/l

#### Triglicerid

37. Triglyceride GPO-PAP Test, Boehringer Mannheim (Germany), referens tartomány: 0-1,7 mmol/l

## 4. 2. HEMOSZTAZEOLÓGIAI MÓDSZEREK

#### Protrombin ráta

8. Organon teszt, referens tartomány: 90-110%

#### Aktivált parciális tromboplasztin idő

8. APTI teszt, Reanal, referens tartomány: 32-45 sec

### **4. 3. HEMATOLÓGIAI MÓDSZEREK**

Trombocita szám

8. 9. Sejtszámoló, Medicor, referens tartomány: 200 000-400 000/μl

Vér hemoglobin koncentráció

8. 9. 25. 35. Hemoglobin, Drabkin eljárás, referens tartomány: 120-170 g/l

Vérsejtek és származtatott paraméterek

35. Automata vérsejtszámláló, Coulter T890 és H2, Coulter Electronics Inc (Hialeach, FL, USA), referens tartományok: vörösvértest szám: 3,81-5,29 T/l, MCV: 80-99 fl

### **4. 4. KATALÁZ VIZSGÁLATI MÓDSZEREK**

Áramlásos citometriai analízis

A mérésekhez FITC-el (fluoreszcens-izo-tiocianáttal) jelzett kataláz antitestet (humán kataláz ellen nyúlban termelt anti kataláz, Oxis Research (Portland, OR, USA)) használtunk. A permeabilizáló IntraStain Fixation and Permeabilisation Kit (Dako). Negatív kontroll fehérvérsejteknel CD 13 (nem permeabilizált), GlycA (permeabilizált) vörösvértesteknel GlycA és CD42 és a pozitív kontroll: mieloperoxidáz volt (Dako). A készülék FACS CALIBUR, Becton Dickinson (Mountain View, CA, USA).

Izoelektromos pont meghatározás

24. 36. Izoelektromos fókuszálással, agaróz gélben pH 3,5-10 Ampholine (LKB, Sweden) jelenlétében.

Izoformák detektálása

14. 15. 24. 25. 36. Kataláz elektroforézis pH: 7,4-en cellulóz-acetát membránon (Sartorius, FRG), ezután blottolás 50 g/l keményítő gélben 2 óráig. Detektálás negatív aktivitás festéssel: inkubálás hidrogénperoxiddal és a kataláz által el nem bontott hidrogénperoxid a KJ-ot jóddá oxidálja, ami a keményítő gélben kék színt képez.

Molekulatömeg meghatározás

a. Gél elektroforézis

15. A kataláz különböző mobilitása a molekulatömegének függvénye, ha különböző koncentrációjú (4,0%, 4,5%, 5,0%, 5,5%, 8,0%) poliakrilamid gélben történik az elektroforézis. A detektálás a kataláz aktivitás segítségével történt. Molekulatömeg markerek: ureáz (272 és 545 kDa), marhamáj kataláz (240 kDa), ferritin (450 és 900 kDa).

b. Gél permeációs kromatográfia

15. Sepharose 6B oszlop (1,5x30 cm) kromatográfia, pH 7,4 foszfát pufferral (0,06 mol/l). A 2 ml-es frakciók kataláz aktivitását mértük. Molekulatömeg markerek: ureáz (272 és 545 kDa), marhamáj kataláz (240 kDa), ferritin (450 és 900 kDa).

c. Kapilláris elektroforézis

Protein 200 LabChip kit és Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Waghaeusel-Wiesental, Germany)

Experion Pro260 Test és Experion készülék, BioRad Laboratories Inc, (Hercules,CA,USA)

d. MALDI-TOF tömespektrometria

Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight:

Bruker BIFLEX III (Bremen, Germany)

Szérum kataláz aktivitás meghatározás

a. Polarográfiás eljárás

A polarográfiás szérum kataláz aktivitás méréskor a csepegő higanyelektródon a hidrogénperoxid az oxigén második lépcsőjének megfelelően redukálódik:



és a hidrogénperoxid lépcső magassága arányos a hidrogénperoxid koncentrációval.

A munka során optimalizáltam: a hőmérsékletet, pH-t, mérési tartományt, szubsztrát koncentrációt, reakcióidőt, enzim aktivitás leállítását és a polarográfiás mérés paramétereit.

Az optimális reakciókörülmények között történő hidrogénperoxid bontást 60 sec után 3-amino-1,2,4-triazollal (kataláz inhibitor) leállítottam és polarográfál mértem a maradék hidrogénperoxid koncentrációját.

A méréshez szükséges oldatok: Szubsztrát: 65  $\mu\text{mol/ml}$  hidrogénperoxid 0,05 mol/l foszfát pufferban pH: 7,4. Enzimgátló: 8,5 mol/l 3-amino-1,2,4-triazol. Vezetősó oldat 0,05 mol/l lítium-klorid. A meghatározás 37°C-on történik.

Minta: 200  $\mu\text{l}$  szérum

Vak:

1000  $\mu\text{l}$  szubsztrát

1000  $\mu\text{l}$  szubsztrát

60 sec inkubálás

1000  $\mu\text{l}$  enzimgátló

1000  $\mu\text{l}$  enzimgátló

200  $\mu\text{l}$  szérum

20 000  $\mu\text{l}$  vezetősó oldat

20 000  $\mu\text{l}$  vezetősó oldat

A polarográfiás mérés paramétereit (OH 102 polarográf, Radelkis, Budapest, Magyarország): érzékenység:  $3 \times 10^{-7}$  A/div, csillapítás: 4 fokozat, kezdő feszültség: 0,0V, feszültségtartomány 0-tól -4V-ig, higanyoszlop magasság: 450 mm, felvételi sebesség 8 min/4V és 4 min/2V, viszonyító (referencia) elektród telített kalomel, agar-agaros KCl áramkulccsal.

A számítás az oxigén-( $h_{O_2}$ ) és hidrogénperoxid lépcsők ( $h_{H_2O_2}$ ) alapján, amiket a polarogramon határozunk meg.

Szérum kataláz aktivitás kU/l=

$$12,5x [(h_{H_2O_2 \text{ vak}} - h_{O_2 \text{ vak}}) - (h_{H_2O_2 \text{ minta}} - h_{O_2 \text{ minta}})]$$

1 U kataláz aktivitás 1  $\mu$ mol szubsztrát bontását jelenti 1 perc alatt, amit 1 l szérumra vonatkoztatunk.

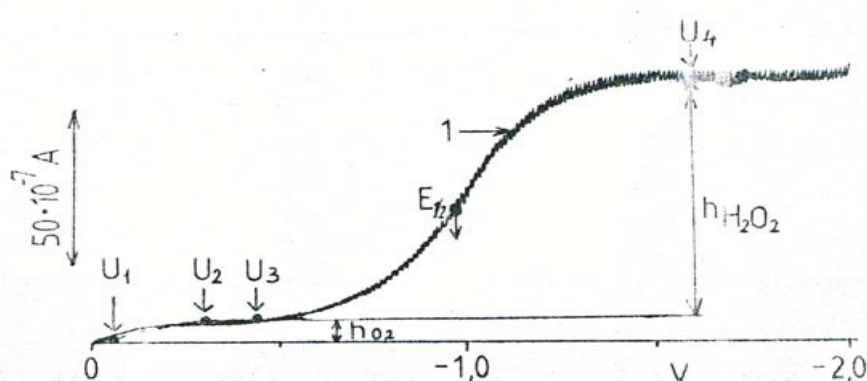
A szubsztrát fogyás 100 kU/l aktivitásig lineáris, ennél nagyobb aktivitás esetén kisebb térfogatú minta vagy rövidebb reakcióidő alkalmazandó.

A meghatározás sorozaton belüli pontossága 25 mérés alapján a CV: 1,9%  $96,28 \pm 1,81$  kU/l aktivitásnál.

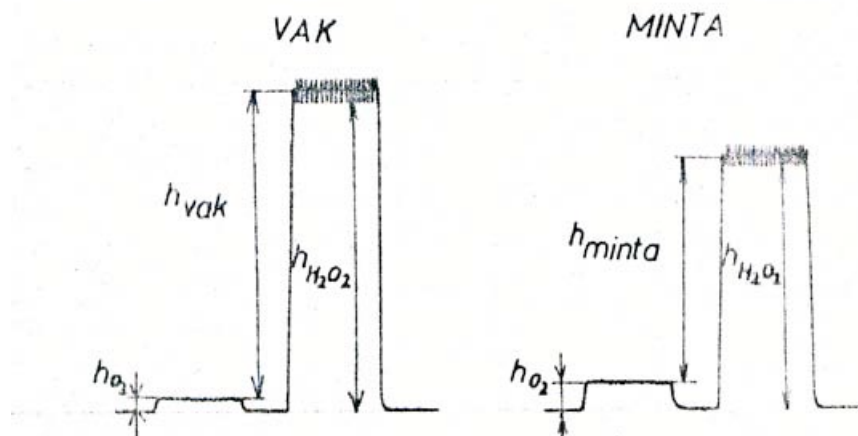
A hagyományos polarográfiás eljárást fokozatosan továbbfejlesztettem.

Ennek első lépése a Tast-Rapid (OH 991 Radelkis, Budapest) adapter alkalmazása volt, amely a higanycsepp életidejét csökkentve a polarogram felvételi idejét rövidítette 8 min-ről 4 min-ra.

A következő lépés a programozható polarográf alkalmazása volt (OH 106, Radelkis, Budapest), amelynél a féllépcső potenciálok ismeretében kellett a programozást végezni és a készülék új típusú, könnyen értékelhető polarogramokat produkált rövidebb idő alatt (30 sec). Ezzel a kataláz meghatározás kivitelezési ideje lényegesen csökkent, mivel a 60 sec reakció után csak 30 sec-ot igényelt a polarogram felvétele és az értékelési idő is rövidült.



A hagyományos polarogramon a kijelölt potenciálok  $U_1$  és  $U_2$  az oxigén lépcsőhöz,  $U_3$  és  $U_4$  a hidrogénperoxid lépcső programozásához a kezdő- és a végpotenciálok.



Az új típusú, gyorsabban felvehető és könnyebben értékelhető polarogramok a minta és a vak esetén.

Góth L. Humán vérszérum kataláz enzim aktivitásának meghatározása. Műszaki doktori értekezés. Sümeg-Veszprém 1971.

Góth L, Mészáros I. Polarographic determination of serum catalase activity. Hungarian Scientific Instruments 1975: 32: 13-16.

Góth L. Szérum kataláz enzim aktivitás meghatározás programozható polarográfval. Kórház és Orvostechnika 1982: 20: 6-9.

Góth L. Determination of catalase enzyme activity in human tissues by programmable polarograph. Hungarian Scientific Instruments 1982: 53: 43-46.

1982-1983, referens tartomány: 20,5kU/l–99,3 kU/l.

Góth L. Szérum kataláz enzim aktivitás meghatározás programozható polarográfval. Kórház és Orvostechnika 1982: 20: 6-9.

1983-1991, referens tartomány: 14,1-99,3 kU/l

Góth L, Németh H, Mészáros I. Clinical study for determination of serum catalase activity. Hungarian Scientific Instruments 1983: 37: 7-12.

#### b. Spektrofotometriás eljárás

1991-, referens tartomány: 14,3 kU/l–86,7 kU/l.

Góth L. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. Clin Chim Acta 1991: 196: 143-152.

22. Korolyuk MA et al. Lab Delo 1988: 16-19 (Russian), nincs referens tartomány.

#### Szövetminták katalázának vizsgálata

12. 13. 15. 17. 20. 21. 24. 36. A cadaveres szövet darabkákat 0,05 mol/l jéghideg foszfát pufferral (pH: 7,4) mostuk. Ezután üveg-teflon homogenizátorral homogenizáltuk, 2000 fordulatszámom 20 percig centrifugáltuk és a felülúszót használtuk fel a mérésekhez.

Vér esetén a vörösvértesteket 3-szor mostuk PBS pufferral, majd egyenlő térfogatú desztillát vízzel, lefagyaszva hemolizáltattuk, centrifugáltuk és a felülúszót használtuk fel a mérésekhez.

#### Szöveti minták fehérje koncentráció meghatározása

24. 36. Lowry OH et al. J Biol Chem 1951: 193: 265

#### Vörösvértest kataláz tisztítás (24)

- a. DEAE-Sephadex kromatográfia: oszlop 2,8x28 cm, elúció 0,06 mol/l foszfát puffer pH: 6,8
- b. CM-Sephadex kromatográfia: oszlop 1,8x30 cm, elúció 0,06 mol/l foszfát puffer pH: 5
- c. Etanol, ammónium-szulfátos precipitáció
- d. Sephadex G-150 és Sepharose 6B kromatográfia, oszlop 2,8x28 cm, elúció 0,06 mol/l foszfát puffer pH: 7,4

#### Vér kataláz meghatározás

17. 18. 20. 21. 26. 29. 30. 32. 35. 36. 37. 20 µl vért (EDTA alvadásgátolt) hígítottunk 4,0 ml 0,06 mol/l foszfát pufferrel (pH: 7,4), majd a vörösvértesteket hemolizáltattuk (0,1 ml) 20 g/l szaponin oldattal. Ebből a hemolizátumból 30 µl használtunk fel az aktivitás méréshez.

Referens tartomány: 63,12-112,6 MU/l.

Góth L. Determination of catalase enzyme activity in human tissues by programmable polarograph. Hung Sci Instr 1982: 53: 43-46.

1992- referens tartomány 80,3-146,3 MU/l

Góth L. Two cases of acatalasemia in Hungary. Clin Chim Acta 1992: 207: 155-158.

Vitai M, Góth L. Reference ranges of normal blood catalase activity and levels in familial hypocatalasemia in Hungary. Clin Chim Acta 1997: 261: 35-42.

## 4. 5. MOLEKULÁRIS BIOLÓGIAI MÓDSZEREK

#### A C-262T polimorfizmus vizsgálata

27. Forsberg et al. (Free Radic Biol Med 2001: 30:500-505) javasolta a C-262T polimorfizmust, mint regulációs mutációt, amely a fehérjeszintézist befolyásolja. A mutáció kimutatására RFLP eljárást dolgozott ki, amelyhez az általa javasolt kataláz primereket, Sma-I enzimes emésztést és a termékek agaróz gélben történő elválasztását foglalja magába.

#### DNS próba jelölés és detektálás

38. Biotinnal történő jelölés után, sztreptavidin-alkalikus-foszfátazzal inkubáltuk és fluoreszcens alkalikus foszfátáz szubsztrátot adtunk hozzá. A fluoreszcens fényt autoradiográfiával detektáltuk. PhotoGene Nucleic Acid

detection System, BioNick Labeling System: Bethesda Research Laboratory, (Life Technologies Inc, Gaithersburg, MD, USA).

#### DNS próba tisztítás

40. A kataláz DNS próba (szonda) előállításának lépései: plasmid bevitele *E. coli* sejtekbe, sejtek szaporítása és DNS tartalmuk kinyerése, tisztítása, a plasmid restrikciója és a próba elválasztása, tisztítása.

#### DNS szekvencia analízis

27. 41. 42. 44. 45. 47. 48. 49. A PCR termékeket agaróz gél elektroforézissel tisztítottuk. Ezután a szekvenáló reakciót Taq Dye-Deoxy Termination Cycle Sequencing Kittel kiviteleztük (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) mindkét irányban és DNA Sequencer Model 373-t, és később 3100 Avant Genetic Analyzer, ABI PRISM (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) alkalmaztunk a szekvencia meghatározásra (MTA Szegedi Biológiai Központ, Genetikai Intézet, Szekvenáló Laboratórium).

#### Egyszálú DNS konformációs polimorfizmus (SSCP)

27. 41. 42. 45. 47. 48. 50. 51. Ennél a mutációs szűrési eljárásnál 5 µl PCR terméket elegyítettünk 25 µl reagenssel, amely 99%-os formamidban 20 mM/l EDTA-t és 0,05% brómfenolkéket, 0,05% xylene cyanolt tartalmazott. Az elegyet 96°C-on inkubáltuk 6 percig, majd jégen gyorsan lehűtöttük.

Az egyszálú DNS-eket 6%-os poliakrilamid gélben (280x180x1,5 mm) szeparáltuk és 100 V feszültséggel 10-16 óráig.

A DNS szálakat ezüstözéssel tettük láthatóvá Silver Staining Kit Bio-Rad (Hercules, CA, USA).

#### Genomiális DNS extrahálás fehérvérsejtekből

38. Hagyományos eljárás Sambrook et al. Molecular cloning. 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989, p 916.

27, 31, 34. 38. 40. 41. 42. 43. 44. 45. 47. 48. 49. 50. 51. QIAGEN Genomic DNA Handbook for Blood DNA Kits. QIAGEN Inc Chatsworth, (CA, USA), később QIAGEN GmbH, Hilden, Germany).

#### Heteroduplex kimutatás

27. 41. 42. 47. 48. 49. 51. Ennél a mutáció szűrési eljárásnál a Hydrolink (AT Biochem, Melvern, PA, USA) protokollt követtük. 2 µl PCR terméket 94°C-ra melegítettünk és inkubáltunk 4 percig. Ezután lassan szobahőmérsékletre hűtöttük és Hydrolink gélen vagy 6%-os poliakrilamid gélben elektroforetizáltuk.

Az elektroforézis és a DNS detektálás azonos az SSCP eljárásával.

#### HLA-DRB allél meghatározás

34. PCR-oligonukleotid hibridizációs teszt, Amplicor HLA DRB teszt, Roche (Basel Switzerland).

#### Polimeráz lánc reakció (PCR)

27. 41. 42. 44. 45. 47. 49. 50. 51. A kataláz génből készített PCR termékek, a 13 exont, az exonokat határoló intronok 5-50 nukleotidját, az 5' vég 165 bp, 3' vég 676 bp-ját tartalmazzák. Az amplifikálási reakció 10,5 µl-ben tartalmazott 1 µl genomiális DNS-t (0,2 µg/µl), a négy dNTP (10 µM/l) 1,6 µl-ben, 1 µl-t mindkét primerből, 0,5 µl Taq polymerase (5U/µl). Az amplifikálási program: 94°C-on 0,5 min, 55°C-on 0,5 min, 72°C-on 1,0 min, a ciklusszám: 30. Készülék: Perkin Elmer Cetus CT1 (NorwalkCT, USA).

A felhasznált primerek Kishimoto Y et al. (Hum Genet 1992: 88:487-490) által a reagensek: Pharmacia, Biotech, később Pharmacia-Amersham (Uppsala, Sweden).

#### Restrikciós Fragment hosszúsági polimorfizmus (RFLP)

42. 43. 44. Ennél a mutáció szűrési eljárásnál 36 µl H<sub>2</sub>O, 5 µl puffer, 8 µl PCR termék, 1 µl enzim (HinfI 18 U/l) elegyét inkubáltuk egy éjszakán át 37°C-on. A keletkezett termékeket 1,2%-os agaróz gélben szeparáltuk és ethidium bromiddal vagy Sybr- Green fluoreszcenciával tettük láthatóvá.

#### Southern blotolás

43. 8 µg genomiális DNS-t emésztettünk HinfI-el és a termékeket 0,8%-os agaróz gélben szeparáltuk, majd nitrocellulóz membránra blottoltuk kapilláris technikával. A kataláz próbát <sup>32</sup>PdCPT random hexamer priming módszerrel jelöltük. A detektáláshoz autoradiográfiát használtunk.

#### Western blotolás

50. Vörösvértest hemolizátumot 6%-os SDS-PAGE elektroforézissel szeparáltuk. A fehérjéket elektro-blottinggal Immobilon P membránra blottoltuk. A detektáláshoz nyúl antikatalázt (Oxys Research, Portland, OR, USA), biotinált nyúl ellenes IgG-t (másodlagos antitest) és avidin-alkalikus foszfátot alkalmaztunk. Az alkalikus foszfát szubsztátot Vecastin ABC-AP kittel tettük láthatóvá (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA).

## 4. 6. SZÁMÍTÁSI MÓDSZEREK

A szérumból kataláz szervi eredetének meghatározásához felhasználtam a következő eljárásokat és korábbi eredményeinket:

a. a szérumból kataláz és a szérumból hemoglobin kapcsolata, mivel mindkettő a vörösvértestek destrukciója során jut a szérumba, azonos módon

b. vérhemoglobin vs szérumból hemoglobin és szérumból kataláz, mivel a hemoglobin és a kataláz poolja egyaránt a vörösvérsejt populáció



c. a korábbi vizsgálati eredmények közül a betegségek speciális markereit, a szervek kataláz aktivitásait.

### A kataláz release számítása

A különböző szövetekből a szérumba jutó kataláz vizsgálatára az egy kompartmentes modellt alkalmaztuk, a szérum aktivitások időbeni meghatározásával. A számításhoz feltételeztük az elsőrendű kapcsolatot az enzim aktivitás és az idő között és a necrotizálódott részből az összes enzim kilúgozódását (was out).

(Sobel BE et al. Estimation of infarct size from serum MB creatinine phosphokinase activity: application and limitations. *Am J Cardiol* 1976: 37: 474-485, és Wilems GL et al. Enzymatic assessment of myocardial necrosis after cardiac surgery: Differentiation from skeletal muscle damage, hemolysis, and liver injury. *Am Heart J* 1985: 109: 1241-1252.)

Minden betegnél külön elvégeztük az elemzéseket, ezek eredményeinek átlagát használtuk fel következtetéseinkhez és átlagos vértérfogattal (5,5 l), hematokrittal számoltunk (0,43).

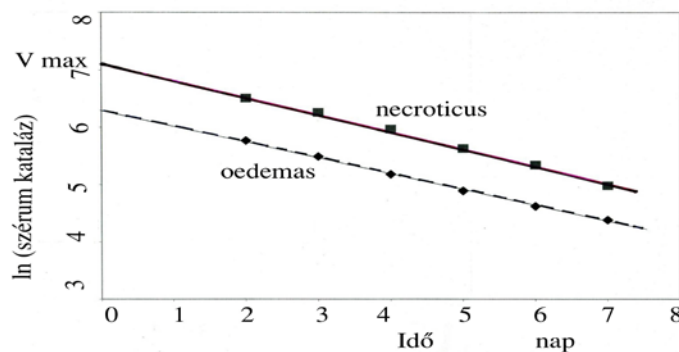
A 0 időtől a t időig tartó kataláz kumulatív release  $A(t)$  számítására a következő egyenlet szolgál:

$$A(t) = P(t) - P_0 + \int_0^t FCR P(t) dt$$

ahol  $P(t)$  plazma aktivitás t időben,  $P_0$  plazma aktivitás 0 időben (steady state aktivitás, referens átlag), FCR eliminációs konstans ( $\text{nap}^{-1}$ ).

A plazmában jutott  $(P(t) - P_0)$  és az eliminálódott  $(\int_0^t FCR P(t) dt)$  kataláz adja a plazma aktuális  $(A(t))$  kataláz aktivitását.

Ha a pillanatnyi kataláz aktivitás természetes alapú logaritmusát az idő függvényében ábrázoljuk, akkor a kapott egyenes iránytangense az FCR értékt, míg a tengelymetszet a maximális kataláz release-t adja meg.



**A szérumban kataláz aktivitás természetes alapú logaritmusának és az idő függvénye az acute pancreatitis két formájában. Az egyenes y tengelymetszete a  $V_{Max}$ -ot, míg a meredeksége a FCR-t adja meg.**

A szövet ml, illetve g ekvivalens

Ezeket úgy definiáltam, mint azt a hipotetikus vér térfogatot (ml) vagy szövet tömeget (g), amely annyi kataláz enzimet tartalmaz, mint amennyi a folyamat során a vérbe/plazmába jutott.

Ezt a szövet ekvivalenst (ml vagy g) az illető szövet teljes térfogatával vagy tömegével hasonlítottam össze annak eldöntésére, hogy a kataláz release reális forrása lehet-e a feltételezett szerv.

Az ekvivalens szövet/vér tömegnek a célszerv teljes tömegéhez történő viszonyítása megmutathatja, hogy a célszerv kizárható-e, mint a megnövekedett szérumban kataláz forrása.

Ha a célszerv tömege kisebb, mint az ekvivalens szerv/vér tömeg, akkor további forrás/szervek vizsgálatával folytatni kell a folyamatot.

Statisztikai módszerek

A munkám során az eltérések vizsgálatára a Student-féle t-eljárást (egy- és két-mintás) használtuk. Az eltérést szignifikánsnak vettük, ha a  $p < 0,05$  vagy 5% (Microsoft Excel).

A viszonyítás a referens tartományhoz, illetve annak átlagához történt.

Kivétel a veleszületett kataláz hiányosoknál történt vizsgálatok, ahol a viszonyítási alap az akatalazémiás, hypokatalazémiás családok normokatalazémiás tagjaiból képzett csoporthoz történt a katalázhiányosok laboratóriumi vizsgálati eredményeinek viszonyítása.

Kisszámú (10-nél kevesebb) minta esetén pedig "matched pair" értékelést végeztünk.

## **4. 7. BETEGEK**

Kórházi és rendelőintézeti betegek  
Városi Kórház, Sümeg

A Sümeg Városi Kórházban/Rendelőintézetben a betegektől a kivizsgálás céljára történt a vérvétel és ezzel céllal érkezett a vér a laboratóriumba. A vérvételhez a betegek hozzájárultak. A klinikus által rendelt laboratóriumi vizsgálatok elvégzése után a maradék vizsgálati mintából történtek a szérumban és a vér kataláz meghatározások.

A kataláz mérési eredmények a rutin vizsgálatok között szerepeltek, felkerültek a lázlapra és a klinikus a diagnosztikai munkájában ezen eredményeket is felhasználta.

Hasonló volt a helyzet azon járóbetegek esetén, akik szűrővizsgálati vérvételhez adták engedélyüket.

Mindkét eljárás a kórházi etikai normáknak megfelelt és a kórházigazgató, mint az etikai tanács elnöke, közreműködésével történt.

### Katalázhiányos családok laboratóriumi vizsgálata

A fenti kataláz szűrővizsgálatok során talált katalázhiányos egyének családtagjait megkértük a közreműködésre. Ez vérvételből és egy kérdőív kitöltéséből állt. A családtagok többsége ebbe beleegyezett és engedélyét aláírásával is elismerte.

A kataláz meghatározáson kívül további laboratóriumi vizsgálatokat is elvégeztünk, amelyek eredményét a beteg családi orvosához eljuttattunk.

A közleményekben a betegek személyiségi jogainak megfelelően személyazonosságuk nem deríthető ki.

Kataláz vizsgálatok a Debreceni Egyetem Klinikai Biokémiai és Molekuláris Patológiai Intézetében

Vizsgálatainkhoz a diagnosztikai célú vérvétellel nyert véreket használtunk fel, amely vérvételhez a betegek a beleegyezésüket adták. Az elrendelt vizsgálatok elvégzése után a maradék véreket/szérumokat anonimá tettük és ezután használtuk fel őket vizsgálatainkhoz.

A vizsgálatok elvégzése után a vizsgálati mintákat az OEC/KBMPI előírásainak megfelelően megsemmisítettük.

A közleményekben a betegek személyiségi jogainak megfelelően személyazonosságuk nem deríthető ki.

### A közreműködő családi orvosok

A kataláz hiányos családok tagjainak családi orvosával tartjuk a kapcsolatot és ők is kértek további a beteg szempontjából fontos, speciális vizsgálatokat.

Az élő kapcsolat révén tájékozodom az akatalazémiás és hypokatalazémiás egyének további sorsáról, betegségeiről.

A magyarországi kataláz hiányról írt közleményeim különlenyomatait rendszeresen eljuttattam a közreműködőknek.

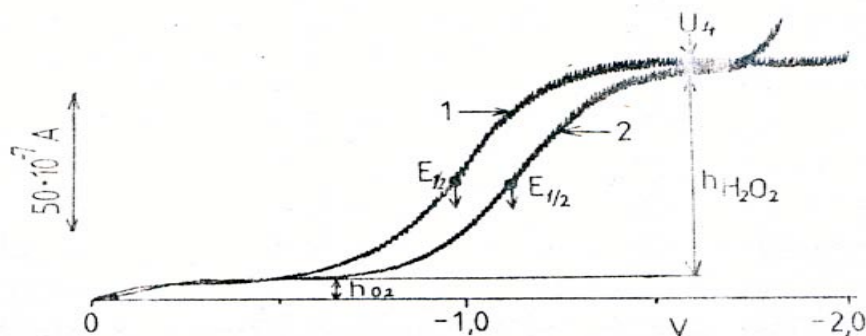
## 5. VIZSGÁLATI EREDMÉNYEK

### 5. 1. A SZÉRUM KATALÁZ

#### 5. 1. 1. A $H_2O_2$ féllépcsőpotenciál változása szérumban [1,6]

A szérumban tartalmú minták polarográfiája során tapasztalható, hogy az oxigén és a hidrogénperoxid lépcső féllépcsőpotenciálja negatív irányba eltolódik.

A féllépcsőpotenciál eltolódás a szérumban fehérje koncentrációjának növelésével 0,9 V-tól egy határértékig (- 1,05 V) tart.



Oxigén és hidrogénperoxid polarográfiás lépcsőknél a féllépcsőpotenciál eltolódása szérumban hatására. 1. szérumban nélkül, 2. 200  $\mu l$  szérumban adása után.

Ez az eltolódás sem a polarogram alakját, sem annak kiértékelését nem befolyásolja, de a programozható műszernél ennek figyelembevételével kell a programozást elvégezni.

#### 5. 1. 2. A szérumban kataláz változása további betegségekben

A kandidátusi értekezésben több megbetegedésben észlelt szérumban kataláz aktivitás növekedéséről számoltam be. Ebben a fejezetben a kandidátusi értekezés utáni vizsgálataimat ismertetem.

##### 5. 1. 2. 1. Szérumban kataláz aktivitás növekedés hemolitikus folyamatokban

Erősen emelkedett szérumban kataláz aktivitást tapasztaltunk a vérében anémia és extravasculáris hemolízis együttes előfordulásakor.

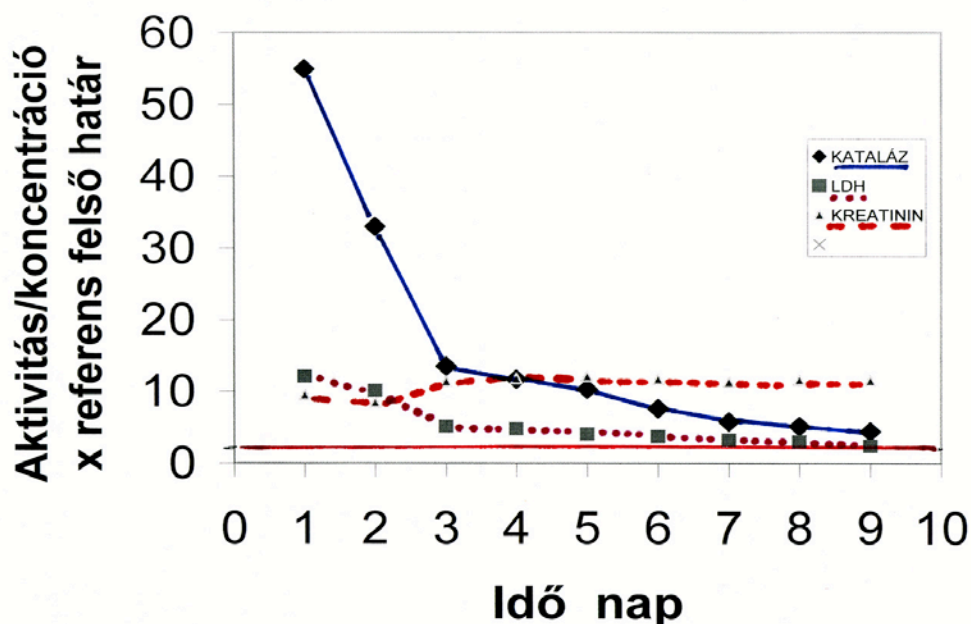
Baleset után a nagymérvű vérzés révén a szövetközi állományba került a vér. Itt a vörösvértestek hemolízise után a belőlük felszabaduló kataláz enzim a keringésbe/szérumba került, majd onnan eliminálódott.

A szérum kataláz maximális értéke a referens átlag 5,46-szoros volt. A baleset utáni 8. napon is a patológiás tartományban volt a szérum kataláz [2].

A legmagasabb (55-szörös) szérum kataláz értéket egy hemoliticus uremias syndromában szenvedő nőbetegnél találtuk, akinél még a felvétel utáni kilencedik napon is 7,7-szeres emelkedés volt tapasztalható. A hemolízis markerei közül a haptoglobin, hematin, methemalbumin, LDH és a szérum hemoglobin jól korreláltak a kataláz emelkedéssel. A veseműködés markerei közül a szérum karbamid és kreatinin koncentrációk is még a 16. napon is emelkedettek voltak.

A kataláz eliminációs vizsgálat eredménye azt mutatta, hogy az igen nagyfokú szérum kataláz emelkedésért mintegy 394 ml vér (7,2%) lehet a felelős [3].

## Szérum markerek hemolitikus uremias syndroma-ban



### 5. 1. 2. 2. A szérum kataláz aktivitás változása máj betegségekből [4,7]

Szérum kataláz aktivitások máj és epeúti megbetegedésekben:

| Megbetegedés              | Szérum kataláz kU/l |      |       |           |
|---------------------------|---------------------|------|-------|-----------|
|                           | Átlag               | SD   | Beteg | Vizsgálat |
| Cirrhosis                 | 55,9                | 24,1 | 52    | 91        |
| Vírus hepatitis           | 59,1                | 24,8 | 315   | 675       |
| Zsír máj                  | 90,8                | 31,9 | 21    | 31        |
| Acute alkoholos hepatitis | 105,1               | 48,2 | 42    | 95        |
| Acute májsorvadás         | 211,8               | a    | 18    | 18        |
| Toxikus hepatitis         | 216,8               | a    | 19    | 54        |
| Cholelithiasis            | 70,8                | 34,1 | 58    | 138       |
| Elhúzódó sárgaság         | 82,1                | 32,7 | 12    | 37        |
| Cholecystitis             | 86,1                | a    | 46    | 101       |

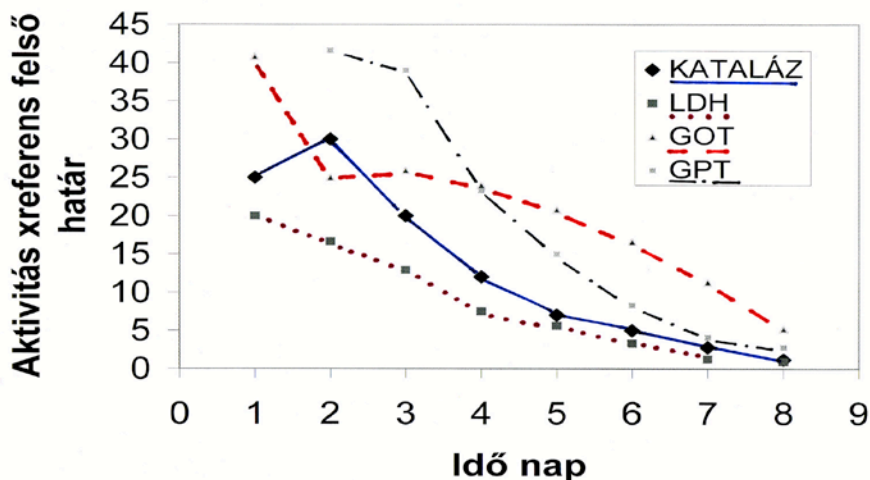
a: log/norm eloszlás

A májbetegségekben a szérum kataláz átlagértékéhez viszonyítva legnagyobb átlagos aktivitás emelkedést toxikus hepatitisben (3,82-szeres) és heveny májsorvadásban (3,73-szeres) kaptuk.

Ennél kisebb volt az aktivitás emelkedés heveny alkoholos hepatitisben (1,85-szoros) és zsír májban (1,6-szoros), míg máj cirrhosisban és vírus hepatitisben gyakorlatilag nem változott a szérum kataláz aktivitás. E két utóbbinál érdemes megjegyezni, hogy a hasonló lokalizációjú GPT cirrhosisban csak kismérvű, míg vírus hepatitisben nagymértékű (45,2-szeres) emelkedést mutatott.

A legnagyobb mérvű szérum kataláz aktivitás növekedést (30,2-szeres) egy baleset következtében kialakult májruptúrában tapasztaltuk.

### Szérum enzimek májrupturában



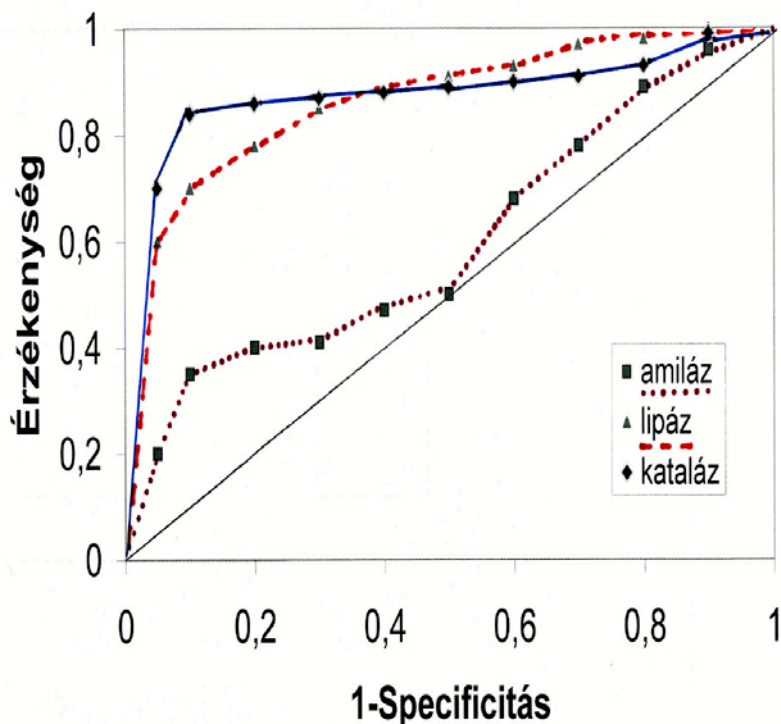
### 5. 1. 2. 3. ROC analízis acute pancreatitisben [9,11]

Mint azt korábban kimutattuk [5-8], a szérumban a kataláz aktivitás jelentősen emelkedik acute pancreatitisben.

Ebben a megbetegedésben a szérumban a kataláz diagnosztikai hatékonyságának további elemzését ROC (Receiver Operating Curves) analízissel végeztük.

Az acute pancreatitis ROC analízise [9] azt mutatta, hogy a kataláz és a lipáz diagnosztikai használhatósága egyértelműen jobb, mint az  $\alpha$ -amilázé. A közel hasonló görbe alatti integrálok (kataláz 0,933, lipáz 0,988) ellenére a nagy enzim aktivitásoknál a kataláz az előnyösebb, míg a kisebb mérvű emelkedéseknél a szérumban a lipáznak jobb a klinikai diagnosztikai használhatósága.

#### Acute pancreatitis ROC analízise



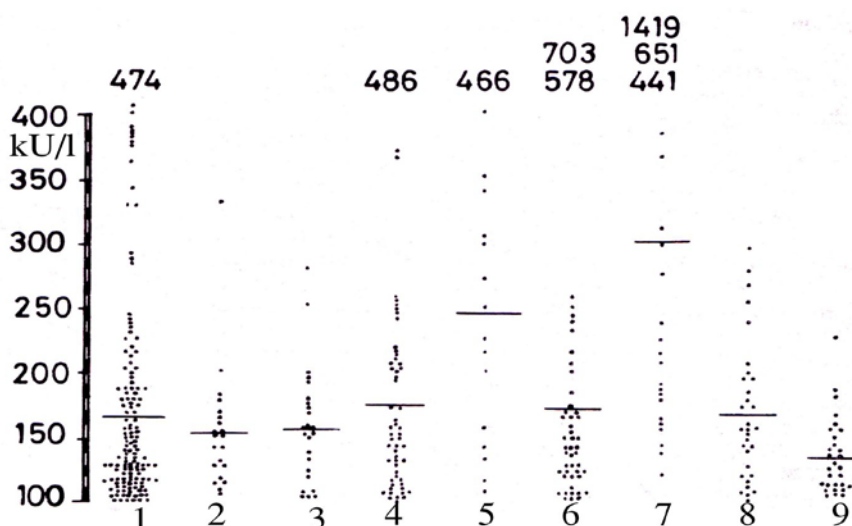
### 5. 1. 2. 4. A szérumban a kataláz patológiás gyakorisága [10, 10]

1984-ben egy 80 ágyas aktív, nagyforgalmú belgyógyászati osztályon minden felvételre került betegnél (3 112) a rutinvizsgálatok közé a szérumban a kataláz meghatározást is beiktattuk, és vizsgáltuk ennek patológiás gyakoriságát, valamint azt, hogy milyen betegségekben emelkedett.

### 3 112 szérumszénvesztés vizsgálati eredmény megoszlása

| Szérumszénvesztés         | n     | %    |
|---------------------------|-------|------|
| Referens tartomány alatti | 37    | 1,2  |
| Referens tartományban     | 2 684 | 86,2 |
| Patológiásan emelkedett   | 391   | 12,6 |

A patológiás gyakoriság a GOT enzimnél volt a legmagasabb (25,6%), ezután következett a kataláz (12,6 %), és a legkisebb a GPT esetén volt (10,5%). A szérumszénvesztés aktivitás betegcsoportok szerinti megoszlását a következő ábra mutatja:



1: szív keringési elégtelenség, 2: akut myocardialis infarctus, 3: vérzések, 4: májbetegségek, 5: akut pancreatitis, 6: intoxikációk, 7: hematológiai megbetegedések, 8: hosszú agónia, 9: vegyes csoport.

#### 5. 1. 3. A szérumszénvesztés mérés diagnosztikai hatékonyságának növelése

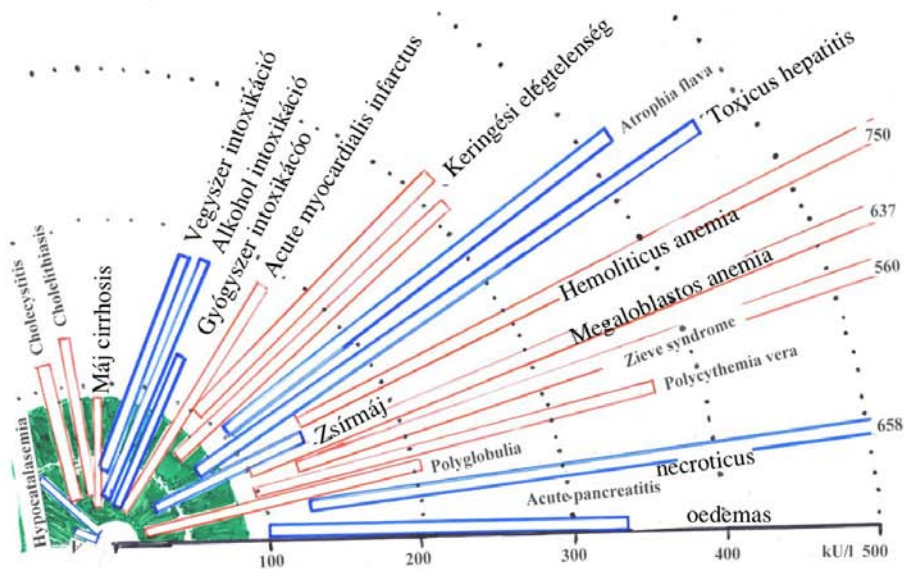
A következő összefoglaló ábra azt szemlélteti, hogy a szérumszénvesztés aktivitás növekedés nem specifikusan jellemző egy megbetegedésre. Ezzel szemben több olyan megbetegedés is van, amelyekhez szérumszénvesztés aktivitás növekedés társul.

Ezeket a megbetegedéseket, illetve az emelkedések nagyságát mutatja be az általam erre a célra szerkesztett a diagnosztikai háló. A közepén lévő sötét



jelzett kör mutatja a referens tartományt, míg az egyes betegségekben mért szérumban kataláz aktivitásokat a különböző téglalapok hosszúsága jellemzi.

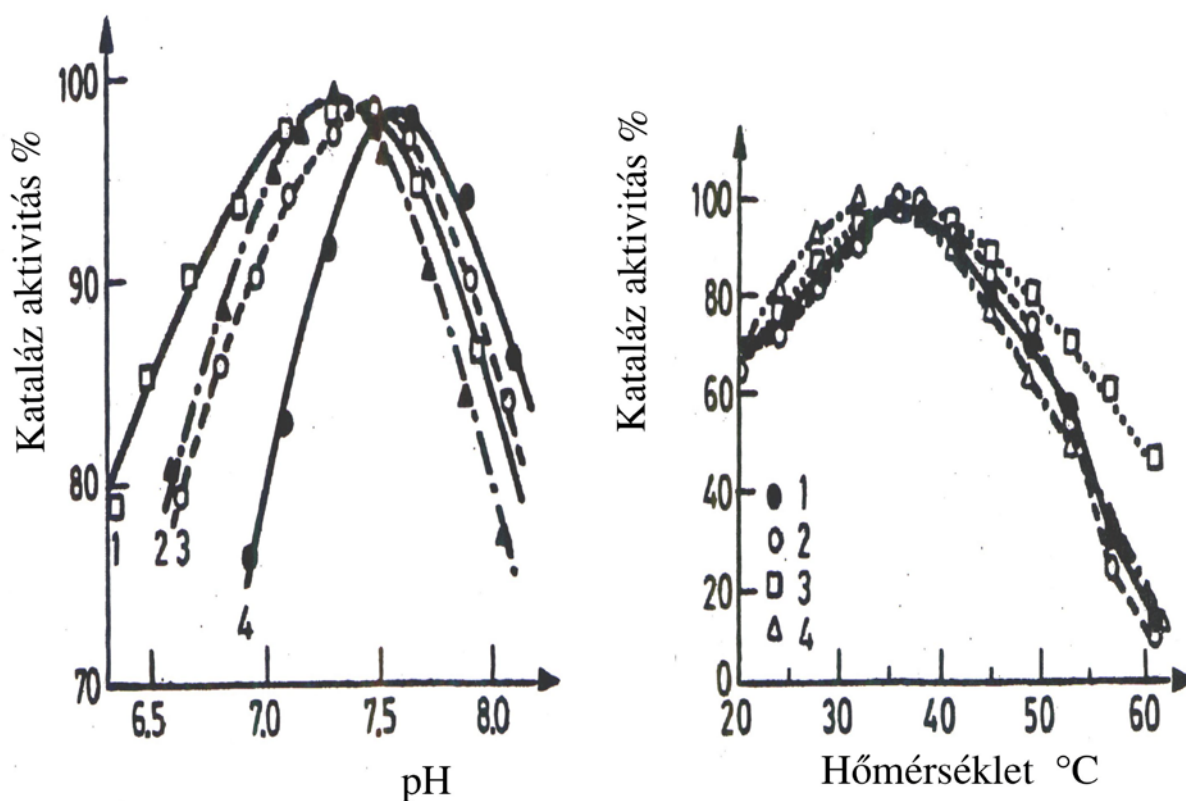
### Szérumban kataláz diagnosztikai háló



Ennek ismeretében vizsgáltam azokat az eljárásokat (szubsztrát-, pH-, hőmérséklet függés, elektroforetikus mobilitás), amelyek az enzim diagnosztikában erre a célra általánosan használatosak.

#### 5. 1. 3. 1. Szubsztrát, pH, hőmérséklet függés [11,12,12,13]

A szérumban hemolitikus-, máj-, szív-, pancreas megbetegedésben, és a megfelelő szervekben (vörösvértest, máj, máj, szív, pancreas) található katalázokat hasonlítottuk össze klinikai kémiai módszerekkel azon célból, hogy a szérumban kataláz növekedéséről megállapíthassam, hogy melyik szerv károsodásának eredménye.



Kataláz aktivitás a pH és hőmérséklet függvényében.

1. Tisztított marhamáj kataláz (SIGMA), 2: máj homogenizátum, 3: patológiás aktivitású szérumban májbetegségben, 4: szérumban, amelynek aktivitása a referens tartományban

A maximális reakciósebesség, a  $K_M$  értékek és a patológiás szérumban nem mutatott összefüggést a neki megfelelő szervből származó katalázzal [11], bár a szérumban és szervi katalázok két csoportja elkülöníthető volt.

Hasonló eredményeket kaptunk, amikor a fenti csoportok kataláz aktivitásainak pH és hőmérséklet ( $T_{opt}$  optimális, aktiválási energia,  $T_{50}$ ) függését vizsgáltuk [12].

### 5. 1. 3. 2. A szérumban kataláz izoenzimeiről/izoformáiról [13,14,15]

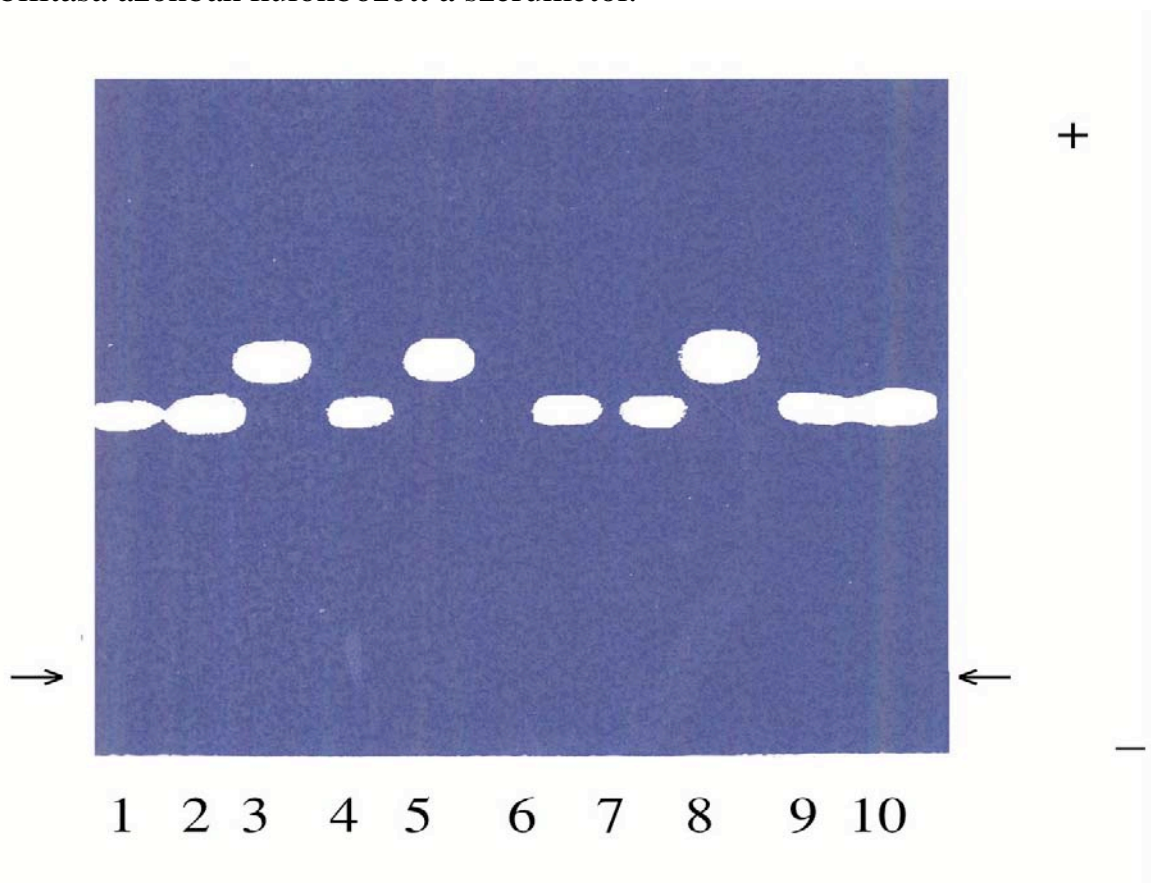
A szérumban kataláz izoenzimeiről/izoformáiról nem voltak irodalmi adatok, ezért először egy módszert dolgoztam ki erre a célra, és ezzel folytattam ezen irányú vizsgálataimat.

A szérumban kataláz elektroforetikus módszerünk alkalmazásakor az elektroforetikus szeparálást cellulózacetát membránon végeztük, majd az elválasztott fehérjéket keményítő gélbe blottoltuk. A keményítő gélhez hidrogénperoxid szubsztrátot adva a kataláz helyén a hidrogénperoxid elbontásra került. Ezután KJ adására a kataláz helyén nem történt színváltozás (színtelen

sáv), míg a katalázt nem tartalmazó helyeken a hidrogénperoxid jóddá oxidálta a KJ-ot, amely a keményítővel élénk kék színt produkált. A kataláz detektálás ílymódon egy negatív festési eljárással történt.

A vizsgálati eredmények referens és különböző megbetegedésekben mért patológiás aktivitású szérumok esetén is csak egy azonos mobilitású kataláz sávot mutattak.

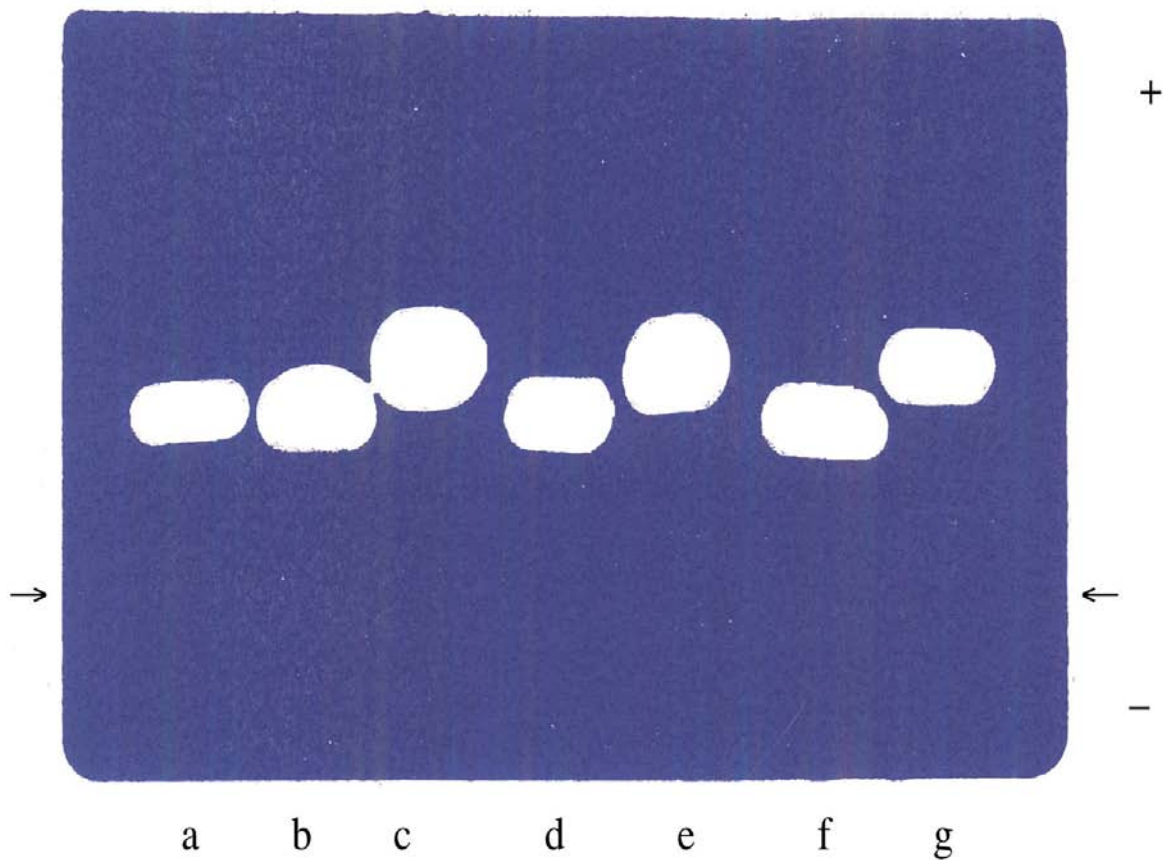
Ez alapján a kataláz enzimnek a szérumban nincs sem izoenzime, sem izoformja. A különböző szervekben lévő katalázok szintén egyetlen, azonos mobilitású sávot produkáltak az elektroforetikus elválasztás során. Ennek a sávnak a mobilitása azonban különbözött a szérumétól.



Szérum és szervhomogenizátumok katalázainak elektroforetikus vizsgálata.

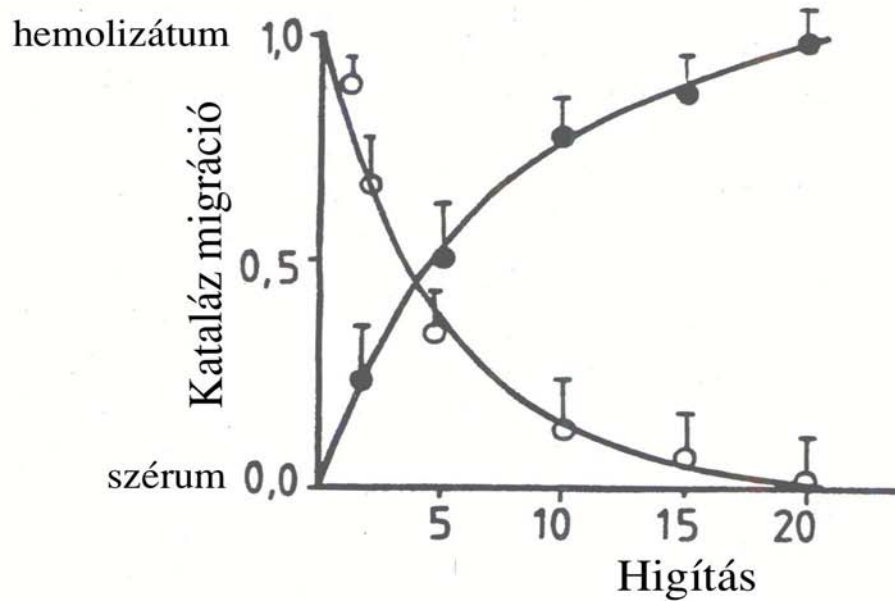
1, 6, 10 nem emelkedett aktivitású szérum, 2: patológiás szérum (acute pancreatitis), 3: pancreas homogenizátum, 4: patológiás szérum (hemolízis), 5: vörösvértest hemolizátum, 7: patológiás szérum (toxicus hepatitis), 8: máj homogenizátum, 9: patológiás szérum (elhúzódó agónia)

Ha szérum katalázhoz vörösvértest hemolizátumot adtunk, akkor a keverék csak egy, a szérumnak megfelelő kataláz sávot eredményez.

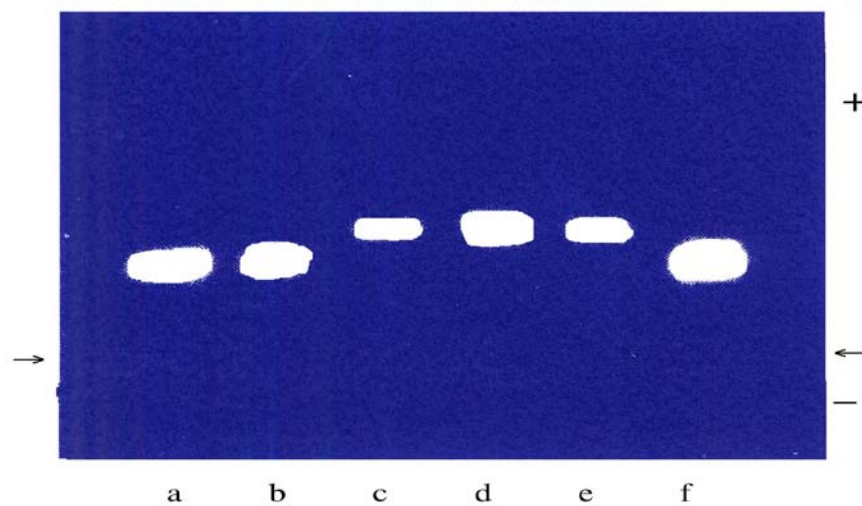


Szérum és szervhomogenizátumok katalázainak elektroforetikus analízise  
 a: referens aktivitású szérumban kataláz, b: szérumban + vörösvértest hemolizátumban,  
 c: vörösvértest hemolizátumban, d: szérumban + máj homogenizátumban, e: máj  
 homogenizátumban, f: szérumban + pancreas homogenizátumban, g: pancreas  
 homogenizátumban

A két különböző mobilitású csoport (szérumban kataláz vs szervhomogenizátumban kataláz) közötti eltérő mobilitás vizsgálatára a szérumban kataláz foszfát pufferral, a vörösvértest kataláz pedig gyűjtött szérumban hígítottuk. Az eredmények az alábbi ábrán azt mutatták, hogy a mátrix változtatásával a két különböző mobilitású kataláz egymásba alakítható, mégpedig reverzibilis módon.



A kataláz enzim mobilitásának változása pufferral és szérummal történő hígításkor. Szérum kataláz hígítása foszfát pufferral: ●, vörösvértest hemolizátum hígítása szérummal: ○



Szérum kataláz tisztítása.

a, b, f: kiindulási szérum minta, c és f : tisztított szérum kataláz, d: vörösvértest kataláz

Ezek alapján a két kataláz izoforma, a szérum és szervben lévő, egymásnak töltési izoformái, amelyek reverzibilisen egymásba alakíthatók.



### 5. 1. 3. 3. A szérumbkataláz differenciál diagnosztikai algoritmus [15,16]

Ha a szérumbkataláz aktivitás meghatározás eredménye rendelkezésre áll, és azt szeretnénk tudni, hogy a patológiás érték mögött milyen elváltozás, betegség áll, akkor további laboratóriumi tesztek eredményeinek felhasználásával az általam szerkesztett algoritmus ebben segítséget nyújthat. Az algoritmus nagyszámú kataláz és más laboratóriumi vizsgálati eredmény felhasználásával készült 1985-ben és a kor akkori színvonalán, (az akkor korszerűnek mondható tesztekkel, ezek referens tartományaival) újdonságként hatott.

Emelkedett szérumbkataláz aktivitás esetében az algoritmus felépítése a következő: első lépésben kéri a következő differenciáló paramétereket: vörösvértest szám, fehérvérsejt szám, GOT-GPT,  $\alpha$ -amiláz, lipáz, szérumbkataláz hemoglobin.

Ezek megadása után a változás nagysága alapján több csoportba sorolja és mindegyik csoporthoz újabb kiegészítő vizsgálati eredményt kér. Ezeknek ugyancsak több csoportba történő sorolása után már kiválaszt egyet a lehetséges patológiás folyamatok közül.

Az algoritmus azokban az esetekben, amikor több paraméter is emelkedett (6. és 7.) az első lépésben vagy amikor egyik sem emelkedett, nem tud működni.

Az algoritmust 1984 januárja és 1985 júniusa között alkalmaztuk a Sümegi Városi Kórház Belgyógyászati Osztályára felvett betegeknél olyan esetekben, amikor a szérumbkataláz 150 kU/l felett volt (326 beteg). A referens tartomány felső határa 99,3 kU/l.

| Differenciáló paraméter                           | Kiegészítő vizsgálat  | Lehetséges patológiás folyamatok  |
|---|---|---|
| 1. Vörösvértestszám                               | a. LDH, Kataláz, Hb, Hp<br>b. LDH, Hb, Hp, Lipid<br>c. Hb, Hp | Anemia perniciosa-hemolitikus<br>Hemolízis-Zieve-syndroma<br>Poliglobulia-Polycythemia vera |
| 2. Fehérvérsejtszám                               | Kataláz, fvs  | Leukemia: chronicus limphoid<br>acute myeloid   |
| 3. GOT-GPT  | CK, CK-MB, LDH  | Acute myocardialis infarctus  |
| 4. $\alpha$ -amiláz                               | lipáz, Hb, Hp   | Acute pancreatitis: oedemas<br>necroticus   |
| 5. Hemoglobin                                     | Hp, Kataláz   | Hemolízis: vérvételi-<br>hemolitikus folyamat   |
| 6. Több paraméter vagy más paraméterek emelkedése |   |   |
| 7. Nincs patológiásan emelkedett paraméter        |   |   |
| 8. Módszerek és referens tartományaik             |   |   |

A rövidítések a következők: Hb: szérumbkataláz hemoglobin, Hp: szérumbkataláz haptoglobulin.

Az algoritmus 150-210 kU/l kataláz aktivitások között 116 esetben (36%) nem tudott eredményt adni, mivel az elsődleges differenciáló paraméterek nem mutattak kóros értékeket. Ez a válasz a közepesen emelkedett (210-450 kU/l) kataláz aktivitásoknál mindössze 4,2%-ban fordult elő.

Az algoritmus által megjelölt folyamatot elfogadhatónak minősítettük, ha az a klinikai diagnosissal megegyezett (algoritmus: acute pancreatitis vs klinikai diagnosis: acute pancreatitis), vagy az egyik válasz mutatott egyezést (májkárosodás vs májcirrhosis, atrophia flava, toxicus májkárosodás) vagy ha egy tünettel volt releváns (poliglobulia vs szíveredetű keringési elégtelenség). Ez a megfelelő válaszcsoport 190 taggal (53%) volt a legnagyobb.

Nem tartottuk elfogadhatónak az algoritmus válaszát 20 esetben (6%), amikor az általa megjelölt folyamat nem egyezett a klinikai diagnosissal vagy annak egyik tünetével sem.

#### **5. 1. 4. A szérumban kataláz szervi eredetének vizsgálata**

##### **5. 1. 4. 1. A szérumban kataláz szervi eredetének vizsgálata kontroll egyéneknél**

Ebben a csoportban olyan egyének szerepelnek, akik nem szenvedtek olyan betegségekből, amelyek szérumban kataláz aktivitás növekedést eredményeznek, és szérumban katalázuk a referens tartományban volt.

A szérumban hemoglobin ismertén nagyon érzékeny hemolízis indikátor, mivel a koncentráció gradiense (vörösvértest vs szérumban) igen magas (>5000), ezért már kismértékű hemolízis is jól detektálható a szérumban hemoglobin méréssel.

A kataláz enzim aktivitás gradiense is hasonló nagyságrendű (>4000).

A szérumban mindig tartalmaz a vörösvértestekből származó hemoglobint, ami az intravaszkuláris hemolízis (vörösvértestek deformálódása, ütközése, vérvétel) eredménye.

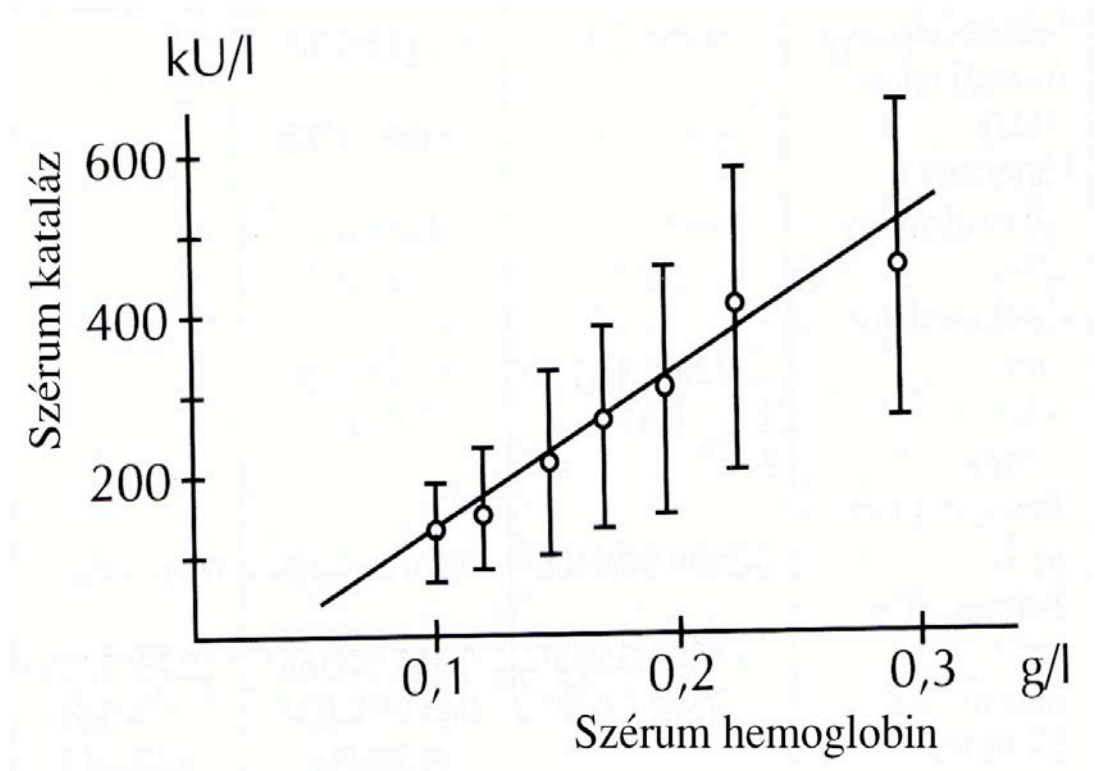
Ezek alapján feltételezhető, hogy kapcsolat van a szérumban hemoglobin koncentráció és szérumban kataláz aktivitás között, amint ezt az ábra mutatja.

A szoros összefüggés ( $p < 0,001$ ,  $r = 0,995$ ) a szérumban kataláz és a vörösvértestekből származó szérumban hemoglobin között utal a szérumban kataláz egy részének a vörösvértest eredetére.

A regressziós egyenes tengelymetszete (20,4 kU/l) azt mutatja, hogy hemolízis teljes hiányában (amikor a szérumban 0 g/l a vörösvértestekből származó hemoglobin koncentrációja) is van a szérumban kataláz enzim, amely tehát nem a vörösvértestekből származik.

Ha ezt a referens szérumban kataláz átlagára (50,5 kU/l) vonatkoztatjuk, akkor az mondható, hogy kontroll egyéneknél a szérumban kataláz 59,6%-a ( $(50,5 - 20,4) / 50,5$ ) származik a vörösvértestekből, míg a 40,4% más forrásokból.

Ezt erősíti meg az átlagos kataláz aktivitás és a hemoglobin koncentrációk eltérő aránya is, amely vér esetén 686, míg szérumban ennél magasabb, azaz 856.



4275 kontroll egyén szérum kataláz és szérum hemoglobin átlagértékeinek összefüggése.

$$y \text{ (szérum kataláz, kU/l)} = 529,5 x \text{ (szérum hemoglobin, g/l)} + 20,4 \text{ (kU/l)},$$

$$p < 0,001, r: 0,995$$

#### 5. 1. 4. 2. A szérum kataláz eredete patológiás folyamatokban [16-20,17-21]

##### 5. 1. 4. 2. 1. Fokozott erythropoesis

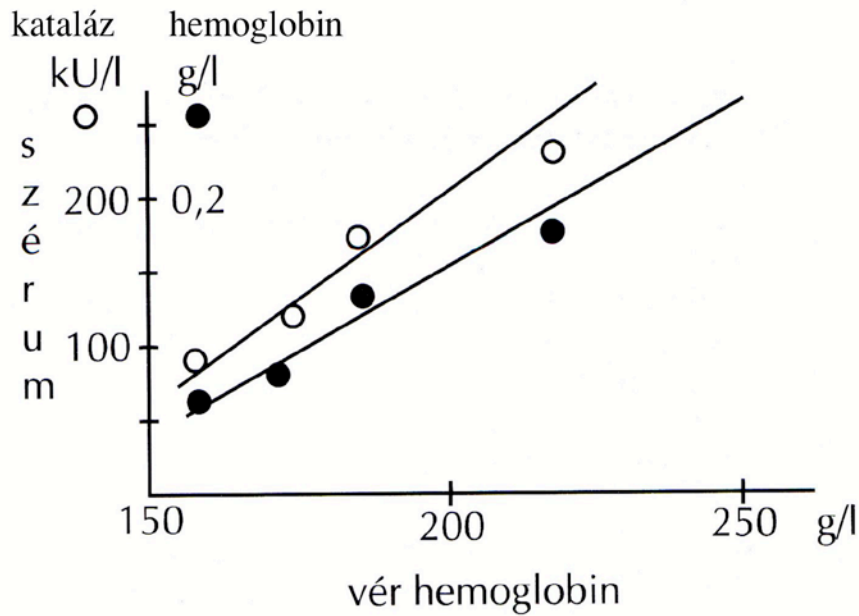
A vér hemoglobin kapcsolata a szérum katalázzal, valamint a szérum hemoglobinnal fokozott erythropoesis során szintén szoros a korrelációt mutat:

$$y \text{ (szérum hemoglobin)} = 0,00216 x \text{ (vér hemoglobin)} + 0,281, r: 9861, p < 0,01$$

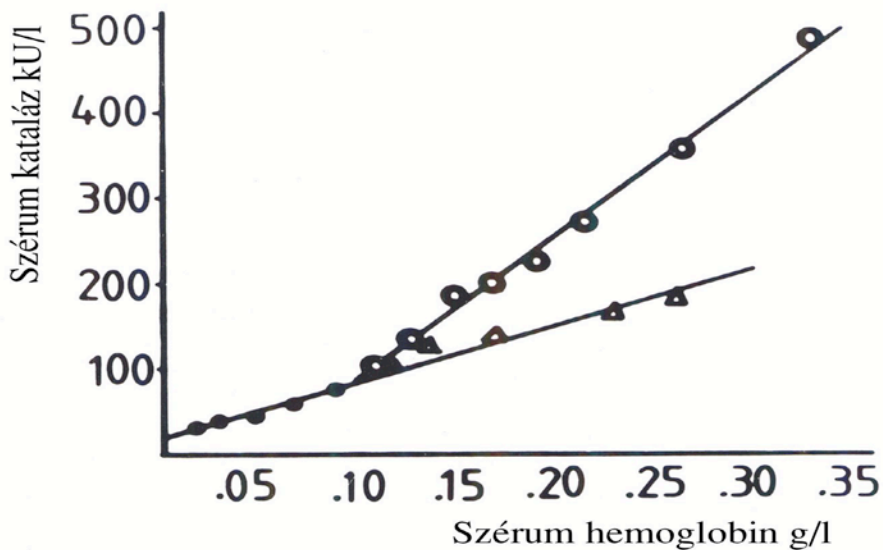
$$y \text{ (szérum kataláz)} = 2,449 x \text{ (vér hemoglobin)} - 50,6, r: 9892, p < 0,01$$

mint ezt a következő ábrák mutatják.





A fokozott erythropoesisben a vér hemoglobin hatása a szérum hemoglobinra és a szérum katalázra



A szérum hemoglobin és szérum kataláz korrelációja: kontrolloknál (●), hemolitikus megbetegedésekben (●) és in vitro hemolízisnél (▲)

A szérum hemoglobin és szérum kataláz két különböző meredekségű ( $y=0,647x+20,3$  és  $y=1,791x-75,28$ ) szakasza a kataláz és hemoglobin különböző eliminációs sebességének tulajdonítható. Az in vitro hemolízisnél ez kizárható és itt a hemoglobin koncentráció növekedésével nem változik az iránytangens, az egyenes folytatása a kezdeti egyenesnek.

## 5. 1. 4. 2. 2. Tranziens folyamatok

A következő tranziens folyamatokban (hemolitikus folyamatok, acute pancreatitis, acute myocardialis infarctus, májbetegségek, szíveredetű keringési elégtelenség) alkalmaztuk a release-eliminációs modellt, amelyből becsléssel kapott eredményeket a következő táblázatban foglaltuk össze.

| Megbetegedés<br>Ekvivalens/            | Felezési idő<br>Nap | Kataláz<br>Release kU | Szerv/szövet<br>ekvivalens | Szerv<br>tömeg | Szerv% |
|--|---------------------|-----------------------|----------------------------|----------------|--------|
| Hemolitikus folyamatok                 |                     |                       |                            |                |        |
| Forrás a vörösvértestek                |                     |                       |                            |                |        |
| Hemoliticus anemia                     | 1,67                | 3740                  | 39,6 ml                    | 5500 ml        | 0,72   |
| Megaloblastos anemia                   | 1,76                | 1914                  | 20,3 ml                    | 5500 ml        | 0,37   |
| Zieve syndroma                         | 1,7                 | 3271                  | 34,6 ml                    | 5500 ml        | 0,63   |
| Acute pancreatitis                     |                     |                       |                            |                |        |
| Oedemas forma:                         |                     |                       |                            |                |        |
| forrás a pancreas                      | 1,28                | 2140                  | 163 g                      | 80 g           | 200,3  |
| forrás a vér                           |                     |                       | 22,6 ml                    | 5500 ml        | 0,41   |
| Necroticus forma:                      |                     |                       |                            |                |        |
| forrás a pancreas                      | 1,16                | 4764                  | 362 g                      | 80 g           | 452,5  |
| forrás a vér                           |                     |                       | 50,4 ml                    | 5500 ml        | 0,91   |
| Szíveredetű keringési<br>elégtelenség: |                     |                       |                            |                |        |
| forrás a szív                          | 1,08                | 2353                  | 99,1 g                     | 300 g          | 33     |
| forrás a máj                           |                     |                       | 15,1 g                     | 15500 g        | 1,01   |
| forrás a vér                           |                     | 113                   | 1,2 ml                     | 5500 ml        | 0,02   |
| Acute myocardialis infarctus:          |                     |                       |                            |                |        |
| forrás a szív                          | 0,97                | 686                   | 34,3 g                     | 300 g          | 11,4   |

A táblázat adataiból arra következtethetünk, hogy a hemolitikus megbetegedésekben a becsült átlagos vörösvértest vesztés egy vérvétellel azonos nagyságrendű, amelynek hiánya a szervezetet nem különösen terheli meg.

Acute pancreatitisben a szérumba került kataláz többszöröse a pancreas kataláz tartalmának, így ez nem lehet a forrás. A párhuzamosan változó hemolízis paraméterek, az elfogadható vér ekvivalens, és a pancreatitis szövettani necroticus/hemorragias képe alapján állítható, hogy acute pancreatitisben a szérum kataláz forrása a pancreas nedvek által destrukciót szenvedett vörösvértestek.

Szíveredetű keringési elégtelenségben hasonlóan nem a szív a szérum kataláz növekedés forrása.

Az acute myocardialis infarctus további példa a két előző folyamatra. Itt sem a szív, hanem más szervek, szövetek károsodása révén nő meg a szérumban a kataláz aktivitás.

### **5. 1. 5. Spektrofotometriás kataláz meghatározási módszer kidolgozása [21,22]**

Az előnyös szempontok ellenére a kataláz meghatározási módszerünket át kellett alakítani spektrofotometriás eljárássá.

Ezt indokolták a spektrofotometriás módszerek majdnem kizárólagos alkalmazása a klinikai kémiai laboratóriumokban, ezek automatizálhatósága, gyorsasága és az, hogy a polarográfia majdnem teljes kiszorulása ezekből a laboratóriumokból, valamint a polarográfia fejlődésének megtorpanása. Napjainkban az elektrokémiai eljárások szinte csak az ion és vérgáz meghatározások (Clark féle oxigén elektród) területén használatosak.

A nagymértékben terjedő POCT (Point of Care Testing) vizsgálatokhoz használható eszközök és műszerek egy része, viszont újra alkalmazni kezdi az elektrokémiai eljárásokat a fotometriások helyett.

A spektrofotometriás eljárásnál színeképzőként ammónium–molibdátot  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$  alkalmaztunk, amely a hidrogénperoxiddal sárga színű komplexet képez, és a klinikai kémiában gyakran használt 405 nm-nél mérhető az abszorbanciája. A komplexképződés egyensúlya nagy (30 mmol/l feletti) ammónium-molibdát koncentráció esetén a teljes komplex képződéshez tolható el, és így a színeképző az enzimreakció leállítására is szolgál, mivel nem lesz elérhető szubsztrát az enzim számára.

A módszer kivitelezése a következő:

Minta 200  $\mu\text{l}$  szérumban, 1000  $\mu\text{l}$  szubsztrát (65  $\mu\text{mol/ml}$  hidrogénperoxid 0,60 mmol/l foszfát pufferban pH: 7,4) 60 sec inkubálás 37°C-on, majd a reakció leállítása 1000  $\mu\text{l}$  32,4 mmol/l ammónium-molibdáttal.

A vak (1): 1000  $\mu\text{l}$  szubsztrát, 1000  $\mu\text{l}$  ammónium-molibdát, 200  $\mu\text{l}$  szérumban.

A vak (2): 1000  $\mu\text{l}$  szubsztrát, 1000  $\mu\text{l}$  ammónium-molibdát, 200  $\mu\text{l}$  puffer.

A vak (3): 1000  $\mu\text{l}$  puffer, 1000  $\mu\text{l}$  ammónium-molibdát, 200  $\mu\text{l}$  puffer a kalibrálást szolgálja.

Az abszorbanciák mérése 405 nm-nél történik.

$$\text{A szérumban a kataláz aktivitás (kU/l, vagy U/ml)} = 271 \times [A(\text{minta}) - A(\text{vak1})] / [A(\text{vak2}) - A(\text{vak3})]$$

A 271-es faktor a következőkből adódik: 5x, mert 200 µl szérumot alkalmazunk 1000 µl helyett; 65x, mert 65 µmol/ml a szubsztrát koncentrációja; 1/1,2 x, mert ez nem 1000 µl-ben van, hanem 1200-ban van a kataláz, és ezek eredményeként  $(5 \times 65) / 1,2 = 271$ .

A meghatározás pontossága alacsony, referens és emelkedett szérum aktivitások esetén

| <b>Kataláz kU/l</b>              | <b>Átlag</b> | <b>SD</b> | <b>CV%</b> | <b>n</b> |
|----------------------------------|--------------|-----------|------------|----------|
| Sorozaton belül                  | 17,04        | 0,928     | 5,44       | 10       |
|                                  | 49,44        | 1,84      | 3,71       | 10       |
|                                  | 438,6        | 18,5      | 4,22       | 10       |
| Sorozatok között<br>(Day to day) | 28,51        | 1,64      | 5,75       | 20       |
|                                  | 61,12        | 2,75      | 4,43       | 20       |
|                                  | 209,7        | 10,58     | 5,04       | 21       |

A szérum kataláz aktivitás lineáris tartománya 2-101 kU/l közötti.

A meghatározást nem befolyásolták a következő szérum komponensek az alábbi koncentrációkig: foszfát (szérum+puffer) 100 mg/l, bilirubin 191 mg/l, lipid 31,2 g/l, hemoglobin 568 mg/l. Az utóbbi esetben figyelembe kell venni, a hemolízis során a vörösvértestekből a fenti koncentrációig a kiszabaduló hemoglobin ugyan nem interferál a módszerrel, de a nagy kataláz tartalmú vörösvértestekből a szérumba jutó katalázt hozzámérjük a szérumban ab ovo jelenlévőhöz.

A spektrofotometriás és a korábbi polarográfiás módszer összehasonlítása a referens és az emelkedett kataláz aktivitásoknál jó egyezést mutatott:

| <b>Módszer</b>    | <b>Átlag</b> | <b>y=mx+b</b>    | <b>r</b> | <b>Tartomány</b> | <b>n</b> |
|-------------------|--------------|------------------|----------|------------------|----------|
| Polarográfia      | 52,67        | $y=1,006x-0,801$ | 0,9314   | 13,5-100,7       | 357      |
| Spektrofotometria | 53,57        |                  |          |                  |          |
| Polarográfia      | 233,52       | $y=1,021x-0,308$ | 0,9809   | 100,9-924,9      | 67       |
| Spektrofotometria | 235,7        |                  |          |                  |          |
| Polarográfia      | 81,18        | $y=1,011x-0,648$ | 0,9602   | 13,5-929,4       | 440      |
| Spektrofotometria | 80,52        |                  |          |                  |          |

A szérum kataláz aktivitás három nap során szobahőmérsékleten 64,7%-al, míg +4°C-on 10,5%-al csökkent. A legkisebb aktivitás csökkenés a -20°C-on történő tároláskor volt tapasztalható, ami 30 napi tárolás esetén mindössze 3,5% volt.

Kereskedelmi kataláz kalibrátor hiányában a szubsztrát hidrogénperoxid koncentrációjának gyakori ellenőrzése titrimetriás (permanganometria) módszerrel ajánlott.

A napi kataláz mérések minőségi kontrollálását keverék szérum napi mérésével és az eredmények Levy-Jennings kontroll kártyán történő ábrázolásával végeztem. A keverék szérum kataláz aktivitása kis térfogatban, lefagyasztva nem változik.

### 5. 1. 6. A szérum kataláz referens tartománya [21,22]

A szérum kataláz diagnosztikai szerepének értékeléséhez szükséges a viszonyítási alap, a referencia tartomány ismerete.

A korábbi polarográfiás eljárással több alkalommal határoztunk meg a referens tartományt, de ezek nem tükrözték az életkor és a nemek vélhető hatását.

A spektrofotometriás eljárással e célból mértük 742 egyén szérum kataláz aktivitását. Ezen egyének közül 608-an (18-60 év) munkavállalók, önkéntesként csatlakoztak, és 168-an (14-18 év) továbbtanulási egészségügyi alkalmassági vizsgálaton bizonyultak megfelelőnek a referens csoportba történő besorolhatóságra. A nők és férfiak aránya 399 és 343 volt.

A spektrofotometriás eljárásnál a szérum hemoglobin mérés segítségével kizártuk a kismértékben hemolizált mintákat.

A nők szérum kataláz aktivitása alacsonyabb ( $p < 0,001$ ), mint a férfiaké, és mindkét csoportban a szérum kataláz az életkorral emelkedik. Ez az emelkedés a nőknél nagyobb mértékű (kataláz= $0,359 \times$ életkor), mint a férfiaknál (kataláz= $0,171 \times$ életkor).

A referens egyének szérum kataláz aktivitásai

| Életkor<br>Év | Kataláz<br>( $\bar{x} \pm SD$ )<br>kU/l | Tartomány<br>kU/l | Percentilis |      |        | n   |
|---------------|---|-------------------|-------------|------|--------|-----|
|               |   |                   | 2,50%       | 50%  | 97,50% |     |
| <b>NŐK</b>    |   |                   |             |      |        |     |
| 14-18         | 42,4±15,0                               | 20,1-75,4         | 20,5        | 41,7 | 71,6   | 93  |
| 19-30         | 43,8±16,4                               | 14,3-91,1         | 17,9        | 43,9 | 81,3   | 120 |
| 31-40         | 45,3±17,9                               | 17,6-96,0         | 19          | 44,3 | 87,4   | 82  |
| 41-50         | 51,7±19,5                               | 20,4-97,3         | 21,2        | 49,9 | 97,3   | 50  |
| 51-60         | 55,5±14,7                               | 24,4-97,3         | 24,4        | 55,8 | 97,3   | 54  |
| Összesen      | 46,2±17,0                               | 14,3-97,3         | 19,4        | 44,4 | 82,8   | 399 |

| Életkor         | Kataláz<br>(x±SD) | Tartomány  | Percentilis |      |        | n   |
|-----------------|-------------------|------------|-------------|------|--------|-----|
|                 |                   |            | 2,50%       | 50%  | 97,50% |     |
| Év              | kU/l              | kU/l       |             |      |        |     |
| <b>FÉRFIAK</b>  |                   |            |             |      |        |     |
| 14-18           | 51,0±18,9         | 17,5-104,8 | 24,6        | 48,9 | 97,8   | 75  |
| 19-30           | 51,4±21,6         | 19,6-102,8 | 21,9        | 50,2 | 100,6  | 74  |
| 31-40           | 55,3±11,5         | 24,6-96,9  | 24,8        | 55   | 90,3   | 78  |
| 41-50           | 56,7±18,2         | 24,3-100,3 | 25,6        | 55,2 | 94,9   | 62  |
| 51-60           | 57,0±20,3         | 25,7-98,6  | 27,1        | 56,6 | 99,1   | 62  |
| Összesen        | 54,4±18,3         | 17,5-104,8 | 25,8        | 53,9 | 92,1   | 342 |
| <b>NŐ+FÉRFI</b> |                   |            |             |      |        |     |
|                 | 50,5±18,1         | 14,3-104,8 | 20,1        | 50,4 | 90,3   | 642 |

#### Irodalom

- Góth L, Vitai M, Mészáros I. A hidrogénperoxid polarográfiás féllépcsőpotenciáljának változása a szérumban fehérje mátrixának hatására. *Klinikai és Kísérletes Laboratóriumi Medicina* 1997; 24: 203-206. [6]
- Góth L, Vitai M, Mészáros I. Vérzéses anémia és extravaszkuláris hemolízis együttes előfordulása. *Laboratóriumi Diagnosztika* 1992; 19: 247-249. [8]
- Góth L, Scheller G. A hemolitikus urémiás szindróma laboratóriumi jelei. *Laboratóriumi Diagnosztika* 1991; 18: 56-57. [9]
- Góth L, Mészáros I, Németh H. Serum catalase in liver diseases. *Acta Biologica Hungarica* 1987; 38:287-290. [7]
- Mészáros I, Góth L, Vattay G. The value of serum catalase activity determination in acute pancreatitis. *American Journal of Digestive Diseases* 1973; 16: 1035-1043.
- Góth L, Mészáros I, Németh H. Serum catalase enzyme activity in acute pancreatitis. *Clinical Chemistry* 1982; 28: 1999-2000.
- Mészáros I, Ládics O, Czehelnik R, Góth L, Németh H, Tóth A. Hiperlipémiával együtt észlelt akut pancreatitis. *Orvosi Hetilap* 1982; 123: 2649-2653.
- Góth L. A szérumban kataláz enzim aktivitás jelentősége az akut pancreatitisz diagnosztikájában. *Laboratóriumi Diagnosztika* 1984; 11: 132-133.
- Fazekasné Kis M, Góth L. A ROC analízis alkalmazása az enzim diagnosztikában. *Klinikai és Kísérletes Laboratóriumi Medicina* 2000; 26:184-186. [11]
- Góth L, Mészáros I, Németh H. A szérumban kataláz meghatározás diagnosztikai jelentősége. *Orvosképzés* 1989;64:257-264. [10]
- Góth L, Illés E. A különböző eredetű kataláz enzimek hidrogénperoxidbontó képességének függése a hidrogénperoxid koncentrációtól. *Kísérletes Orvostudomány* 1985; 37: 607-612. [13]
- Góth L. Heat and pH dependence of catalase. A comparative study. *Acta Biologica Hungarica* 1987;38: 279-285. [12]
- Góth L. No catalase isoenzymes in serum. *Clinical Chemistry* 1987; 33: 2302-2303. [14]
- Góth L. Serum catalase: Reversibly formed charge isoform of erythrocyte catalase. *Clinical Chemistry* 1991; 37: 2043-2047. [15]

15. Góth L. Laboratóriumi eredmények diagnosztikai jelentőségének növelése számítógép alkalmazásával, különös tekintettel a polarográfiás kataláz meghatározásra. Kórház és Orvostechnika 1986: 26: 150-152. [\[16\]](#)
16. Góth L. Origin of serum catalase activity in acute pancreatitis. Clinica Chimica Acta 1989: 186: 39-44. [\[17\]](#)
17. Góth L. A kataláz enzim és a pancreatitis acuta. Orvosi Hetilap 1997: 138: 825. [\[19\]](#)
18. Góth L. A szérum kataláz eredete egészségeseknél és különböző megbetegedésekben. Lege Artis Medicinae 1993: 3: 922-928. [\[21\]](#)
19. Góth L. Origin of serum catalase in healthy subjects and in some hematologic diseases. Clinical Chemistry and Enzymology Communications 1989: 1: 329-334. [\[18\]](#)
20. Góth L. Origin of serum catalase in acute liver congestion due to cardiac circulatory failure. Clinical Chemistry and Enzymology Communications 1991: 4: 51-56. [\[20\]](#)
21. Góth L. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. Clinica Chimica Acta 1991: 196: 143-152. [\[22\]](#)

## 5. 2. A VÖRÖSVÉRTEST KATALÁZ

### 5. 2. 1. A vérsejtek kataláz tartalma

A vörösvértest és vér kataláz, bár nem azonos fogalmak, de gyakran azonos értelemben használja őket az irodalom. Ennek indoklása a következő lehet.

A vérben a kataláz a sejtekben és a plazmában lokalizálódik. Normál térfogati viszonyok esetén a hematokrit 40%, plazma 60%, fehérvérsejt és trombocita kisebb, mint 1%.

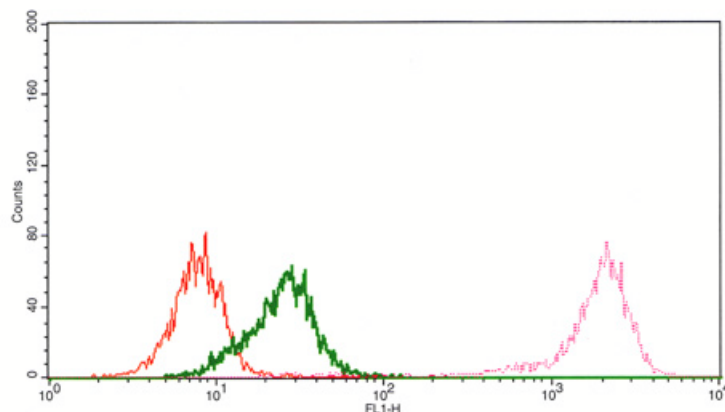
Az egyes alkotók kataláz aktivitása (U) jelentősen változó: a vörösvértesteké 251 177 kU/l [1], a plazmáé 47,9 kU/l [2], a fehérvérsejteké és a trombocitáké kevesebb, mint 100 kU/l [3, 4].

|                   | Vörösvértest         | Fehérvérsejt         | Trombocita            | Plazma            |
|-------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|-------------------|
| Sejt/ $\mu$ l     | $5 \times 10^6$      | $5 \times 10^3$      | $2 \times 10^5$       | -                 |
| Sejt/l            | $5 \times 10^2$      | $5 \times 10^9$      | $2 \times 10^{11}$    | -                 |
| U/sejt            | $2,2 \times 10^{-6}$ | $1,3 \times 10^{-8}$ | $1,3 \times 10^{-10}$ | -                 |
| U/l               | $110 \times 10^6$    | $6,5 \times 10$      | $6,4 \times 10$       | $5,5 \times 10^4$ |
| A vér kataláz %-a | 99,93                | 0,001                | 0,001                 | 0,067             |

Ezek az adatok azt mutatják, hogy a vér kataláz több, mint 99%-a a vörösvértestekből származik, tehát mindkét elnevezés használható. Természetesen mindig definiálni kell, hogy mire történik a viszonyítás.

A vér kataláz 113,3 MU/l referens átlaga 1 l vérről vonatkozik. Ha ezt 1 l vörösvértestre vonatkoztatnánk, akkor a 113,3 MU/l (vér) aktivitást 0,45-tel (hematokrit) osztani kell, ami 251,7 MU/l (vörösvértest) aktivitást eredményez.

A humán fehérvérsejtek flow cytometry-ás analízisét mutatja a következő ábra



A fehérvérsejtek sejtek kataláz tartalmának detektálása flow cytometry-ával. Negatív kontroll: a bal oldali sejt populáció, kataláz tartalmú sejtek: a középső sejt populáció, pozitív kontroll jobb oldali sejtpopuláció (jól festődő jelzett mieloperoxidáz).

A félkvitatív flow cytometriás vizsgálati eredmények alapján mondható, hogy a vérsejtek kataláz tartalma a következő sorrendben csökken:

vörösvértest>polimorf nuklearis sejt>monocita>lymphocita, trombocita.

A kataláz lokalizációja a vörösvértestek, lymphociták, trombociták esetén elsődlegesen a vérsejtekben, míg a monociták és a polimorf nukleáris sejteknél ezek felszínén is detektálható

### 5. 2. 2. A vér kataláz meghatározási módszere [1,2,5,25,22,29]

A vér kataláz meghatározáshoz a szérum kataláz mérésre kidolgozott hidrogénperoxid mérési eljárásunkat [2] alkalmaztuk, amelyet a vér magas kataláz aktivitása miatt a következőként módosítottunk [5].

Az EDTA alvadásgátlóval nyert vért foszfát pufferrel (60 mmol/l, pH: 7,4) hígítottuk (20 µl vér 4 000 µl foszfát pufferbe), ezután a vörösvértesteket 100 µl szaponin oldattal (20 g/l) hemolizáltattuk minimum 5 percig.

Vizsgálati minta: a hemolizátumból 30 µl-t mértünk ki és inkubáltuk 37°C-on 1 000 µl szubsztráttal (65 µmol/ml hidrogénperoxid, foszfát pufferben (60 mmol/l, pH: 7,4) pontosan 60 sec-ig. Az enzimatis reakció: 1 000 µl ammonium-molibdát (32,4 mmol/l) adásával állítottuk le. Ez a reagens színképzőként is szolgál.

A vak 1: 1 000 µl szubsztrátot, 1 000 µl molibdátot és 30 µl hemolizátumot, a vak 2: 1 000 µl szubsztrátot, 1 000 µl molibdátot, 30 µl puffert és a vak 3: 1 000 µl puffert, 1 000 µl molibdátot és 30 µl puffert tartalmazott.

A keletkezett sárga szín intenzitását (A) 405 nm-nél mértük.

$$\text{A vér kataláz aktivitás (MU/l)} = \frac{[A(\text{minta}) - A(\text{vak1})]}{[A(\text{vak2}) - A(\text{vak3})]} \times 4,26 \times 10^2$$



A számítási faktor:  $65 \times 200 \times 30/1000 \times 4\ 000/4\ 100$ , ahol 65  $\mu\text{mol/ml}$  a szubsztrát hidrogénperoxid koncentrációja, 200-szoros a vér hígítása (20  $\mu\text{l}$  4000  $\mu\text{l-re}$ ), a méréshez 30  $\mu\text{l-t}$  használunk 1 000  $\mu\text{l}$  helyett, és a 100  $\mu\text{l}$  szaponin adásával hígul a minta, mivel 4 000  $\mu\text{l}$  helyett 4 100  $\mu\text{l-ben}$  van.

A nagy kataláz koncentráció, és a nagy specifikus aktivitás miatt a kataláz aktivitást  $M(10^6)$  U per liter (vér)-ben adjuk meg.

A meghatározás sorozaton belüli pontossága  $CV=3,1\%$  ( $67,0 \pm 1,43$  MU/l, n: 21), míg a sorozatok (napok) közötti pontossága  $CV=5,1\%$  ( $80,3 \pm 2,49$  MU/l, n: 22).

Kereskedelmi kataláz kalibrátor hiányában a szubsztrát hidrogénperoxid koncentrációjának gyakori ellenőrzése titrimetriás (permanganometria) módszerrel ajánlott.

A napi kataláz mérések minőségi kontrollálását keverék hemolizátum napi mérésével és az eredmények Levy-Jennings kontroll kártyán történő ábrázolásával végeztem. A keverék hemolizátum kataláz aktivitása kis térfogatban, lefagyasztva nem változik.

### **5. 2. 3. A vér kataláz referens tartománya [1,25]**

A vér kataláz referens tartományának meghatározásához 880 nő és 876 férfi vizsgálati eredményeit használtuk fel, akiknek a kiválogatása a következőként történt.

1991-ben az OTE Társadalomorvostani Intézete, a Népjóléti Minisztérium, a Környezetvédelmi és Vízgazdálkodási Minisztérium, az Országos Társadalombiztosítási Főigazgatási Felügyelet kezdeményezésével és anyagi támogatásával referencia környezetnek (viszonyítási alapnak) a Bakony és a Kisalföld találkozásánál található kis lélekszámú településeket jelölték ki: Zalaszegvár (124), Zalameggyes (112), Hosztót (94), Megyer (263), Gógánfa (583), Szentimrefalva (169), Ukk (272), Zalagyömörő (343), Nemeshany (280), Káptalanfa (588), Gyepükaján (296), Bodorfa (112).

A helyi családi orvosokhoz szakorvosok csatlakoztak és részletes vizsgálatokban (anamnézis, szív, mellkas, vérnyomás, visszér, has, máj, tüdő, légzés, emlő) részesült a 12 település 14 és 93 év közötti 3 756 lakosa. A fenti vizsgálatokhoz laboratóriumi (vizelet, vércép, glükóz) vizsgálatok is készültek.

Ebből a csoportból történt a referens egyének kiválogatása a következő szempontok alapján: akut, krónikus betegség, folyamatos gyógyszeresedés hiánya, továbbá a fenti vizsgálatokkal kóros eltérés nem mutatható ki.

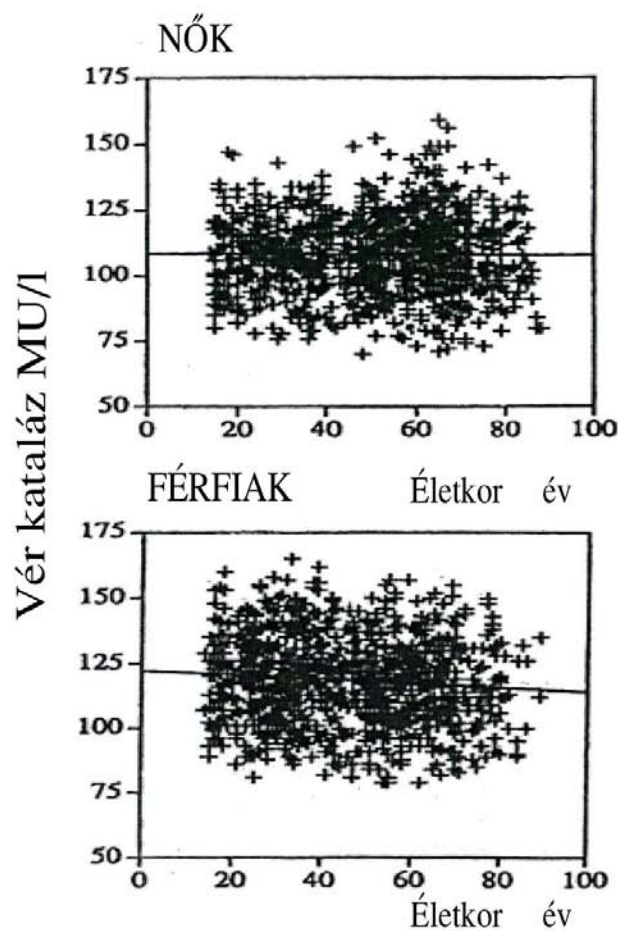
### A felnőtt nők vér kataláz aktivitásai

| Életkor<br>Év | Kataláz<br>MU/l<br>Átlag±SD | Kataláz/hemoglobin<br>MU/g<br>Átlag±SD | n          |
|---------------|-----------------------------|--|------------|
| 14-20         | 107,4±16,0                  | 0,841±0,123                            | 61         |
| 21-20         | 108,4±12,3                  | 0,845±0,094                            | 106        |
| 31-40         | 108,7±13,9                  | 0,839±0,102                            | 129        |
| 41-50         | 107,0±13,5                  | 0,842±0,0101                           | 122        |
| 51-60         | 109,3±14,0                  | 0,843±0,105                            | 170        |
| 61-70         | 108,3±16,0                  | 0,848±0,118                            | 187        |
| 71-80         | 106,3±15,1                  | 0,833±0,109                            | 78         |
| 81-90         | 105,9±13,5                  | 0,820±0,108                            | 27         |
| <b>Összes</b> | <b>107,7±14,4</b>           | <b>0,841±0,117</b>                     | <b>880</b> |

### A felnőtt férfiak vér kataláz aktivitásai

| Életkor<br>Év | Kataláz<br>MU/l<br>Átlag±SD | Kataláz/hemoglobin<br>MU/g<br>Átlag±SD | n          |
|---------------|-----------------------------|--|------------|
| 14-20         | 120,1±15,9                  | 0,856±0,107                            | 69         |
| 21-20         | 119,5±17,0                  | 0,844±0,115                            | 159        |
| 31-40         | 121,5±17,1                  | 0,855±0,126                            | 156        |
| 41-50         | 117,5±16,2                  | 0,842±0,101                            | 116        |
| 51-60         | 117,3±17,2                  | 0,844±0,138                            | 156        |
| 61-70         | 117,2±10,3                  | 0,848±0,118                            | 142        |
| 71-80         | 115,0±16,8                  | 0,867±0,126                            | 62         |
| 81-90         | 114,8±18,0                  | 0,855±0,116                            | 16         |
| <b>Összes</b> | <b>117,9±16,9</b>           | <b>0,849±0,119</b>                     | <b>876</b> |

A fenti eredmények azt mutatják, hogy a nők átlagos vér kataláza szignifikánsan ( $p < 0,001$ ) alacsonyabb, mint a férfiaké ( $107,7 \pm 14,4$  MU/l vs  $117,9 \pm 16,9$  MU/l), míg a kataláz és hemoglobin arány nem változott ( $p > 0,1$ ) azaz  $0,841 \pm 0,119$  és  $0,841 \pm 0,107$ .



A referens egyének vér kataláz aktivitásának változása az életkor függvényében

A referens egyének vér kataláz aktivitása (y), kataláz/hemoglobin aránya (z) igen kis  $r$  mértékben, de különbözőként változik férfiaknál és nőknél az életkor (x) függvényében, mint ezt az alábbi regressziós egyenesek, és korrelációs együttható mutatják.

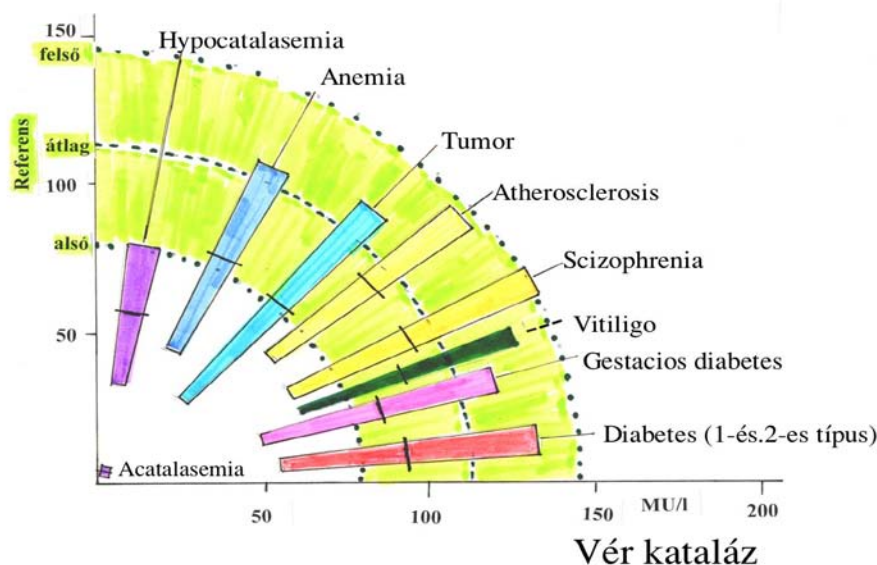
|          |                         |            |          |
|----------|-------------------------|------------|----------|
| Férfiak: | $y = 0,084 x + 122,3$   | $r: 0,090$ | $n: 876$ |
| Nők:     | $y = 0,016 x + 108,7$   | $r: 0,09$  | $n: 880$ |
| Férfiak: | $z = 0,00029 x + 0,835$ | $r: 0,045$ |          |
| Nők:     | $z = 0,00010 x + 0,847$ | $r: 0,017$ |          |

#### 5. 2. 4. A vér kataláz aktivitás különböző megbetegedésekben

Egy 3 éves vizsgálati program keretében 28 252 beteg vér katalázát határoztuk meg (Laboratórium, Városi Kórház, Sümeg) és kerestük azokat a megbetegedéseket, folyamatokat, amely csökkent vér kataláz aktivitással járnak. Ezeket a vizsgálatokat tovább folytatva a Debreceni Egyetem, Orvos- és Egészségtudományi Centrum, Klinikai Kémiai Intézete, ma Klinikai Biokémiai és Molekuláris Patológiai Intézet, valamint a Klinikai Kémiai Analitikai Tanszék közreműködésével.

A vér kataláz aktivitásának csökkenését különböző megbetegedésekben az alábbi diagnosztikai háló szemlélteti.

A vér kataláz aktivitás növekedését ritkán tapasztaltuk, és sem ismert betegséggel/tünettél, sem irodalmi adatokkal nem tudtuk korreláltatni.



##### 5. 2. 4. 1. Anemiák [6,26]

2 884 anemias beteg mutatott szignifikánsan ( $p < 0,005$ ) csökkent vér kataláz ( $83,7 \pm 16,4$  MU/l) aktivitást. Ez a kataláz aktivitás korrelált a vér hemoglobin koncentrációval ( $y_{\text{vérkataláz}} = 0,683x_{\text{vérhemoglobin}} + 18,16$ ,  $r: 0,6954$ ).

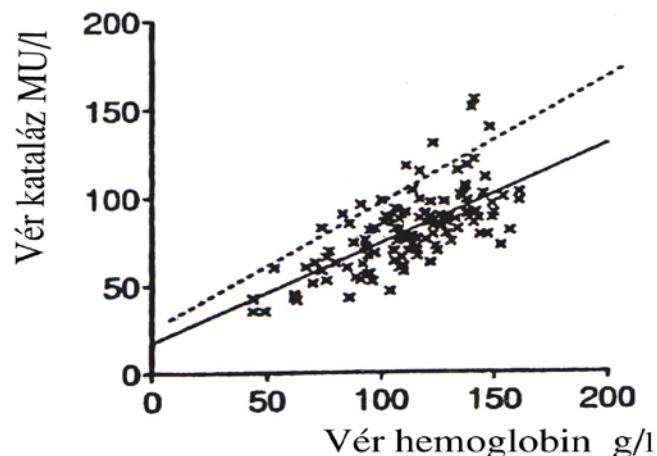
A referens tartomány alsó határa alatti kataláz aktivitást az anemiasok 8,4%-ában tapasztaltunk és ezek az anemiák a következők voltak: vashiány (84), vérzéses (70), aplasticus (10), megaloblastos (14), leukemias (16), és chronicus

(vese) megbetegedésekben kialakult (55) anémia. Ezekben az esetekben az anemiák a felelősek a vér kataláz csökkenésért.

#### 5. 2. 4. 2. Tumorok [6,26]

130 különböző tumorban (hematologiai: 30, gastrointestinalis: 29, tüdő: 17, urogenitalis: 14, emésztőszervi: 14, emlő: 13 és vegyes: 13) és annak különböző fázisaiban (IUCC szerint T: 2,6, N: 2,3, M: 2,1) szenvedő beteg vér kataláz aktivitásait vizsgáltuk. Az átlagos vér kataláz aktivitás szignifikáns ( $p < 0,001$ ) csökkenést mutatott ( $80,8 \pm 21,5$  MU/l). A betegek 49,2%-nak a referens tartomány alsó határa alatt volt a vér kataláz aktivitása.

Annak eldöntésére, hogy ez a vér kataláz aktivitás csökkenés a tumoros betegek anémiajanak (tumoros:  $112,5 \pm 18,9$  g/l, kontroll:  $133,4 \pm 11,6$  g/l) a tumornak vagy mindkettőnek tulajdonítható, vizsgáltuk a vér hemoglobin és vér kataláz összefüggést kontrolloknál és tumoros betegeknél.



A vér hemoglobin és a vér kataláz összefüggése.

A tumoros betegek eredményei x-el ábrázolva, a korrelációs egyenest folytonos vonal ( $y = 0,573x + 17,03$ ,  $n: 130$ ,  $r: 0,690$ ) mutatja. A kontrolloknál az összefüggést a szaggatott vonal mutatja ( $y = 0,682x + 18,16$ ,  $n: 2884$ ,  $r: 0,6954$ ).

A két egyenes iránytangensének különbsége (0,682 és 0,573) azt mutatja, hogy az anémián túlmenően a tumoros folyamat is felelős a csökkent kataláz aktivitásáért.

#### **5. 2. 4. 3. Atherosclerosis [6,26]**

A vér kataláz aktivitás változását elsőként vizsgáltuk nagyszámú (1670) artherosclerosisos betegnél. A vizsgálati eredmények szignifikánsan ( $p < 0,001$ ) csökkent ( $104,8 \pm 18,2$  MU/l) vér kataláz mutattak. A referens tartomány alatti vér kataláz a betegek 4,9%-ában volt kimutatható.

A vér kataláz aktivitás csökkenés nem korrelált a betegség klinikai súlyosságával. Ha az artherosclerosis a coronaria és cerebralis arteriakat érintette, mérhető a legkisebb kataláz aktivitás ( $102,6 \pm 17,5$  MU/l, n: 660). Ennél magasabb volt a kataláz aktivitás cerebrovascularis megbetegedésben ( $105,1 \pm 16,8$  MU/l, n: 509) és coronaria arterialis megbetegedésben ( $107,1 \pm 20,4$  MU/l, n: 501).

A betegek és a kontrollok vér hemoglobinja nem mutatott szignifikáns ( $p > 0,78$ ) eltérést.

#### **5. 2. 4. 4. Schizophrenia [6,26]**

Schizophreniában is elsőként vizsgáltuk a vér kataláz aktivitását és kaptunk szignifikáns ( $p < 0,001$ ) csökkenést ( $105,6 \pm 20,5$  MU/l, n: 275). A betegeknél anemia nem volt kimutatható és közel 10%-ban volt a kataláz aktivitás a patológiásan alacsony tartományban. A schizofrenia különböző típusai (paranoid, reactive, residual) nem eredményeztek különbséget a vér kataláz aktivitásban.

A betegek és a kontrollok vér hemoglobinja nem mutatott szignifikáns ( $p > 0,89$ ) eltérést.

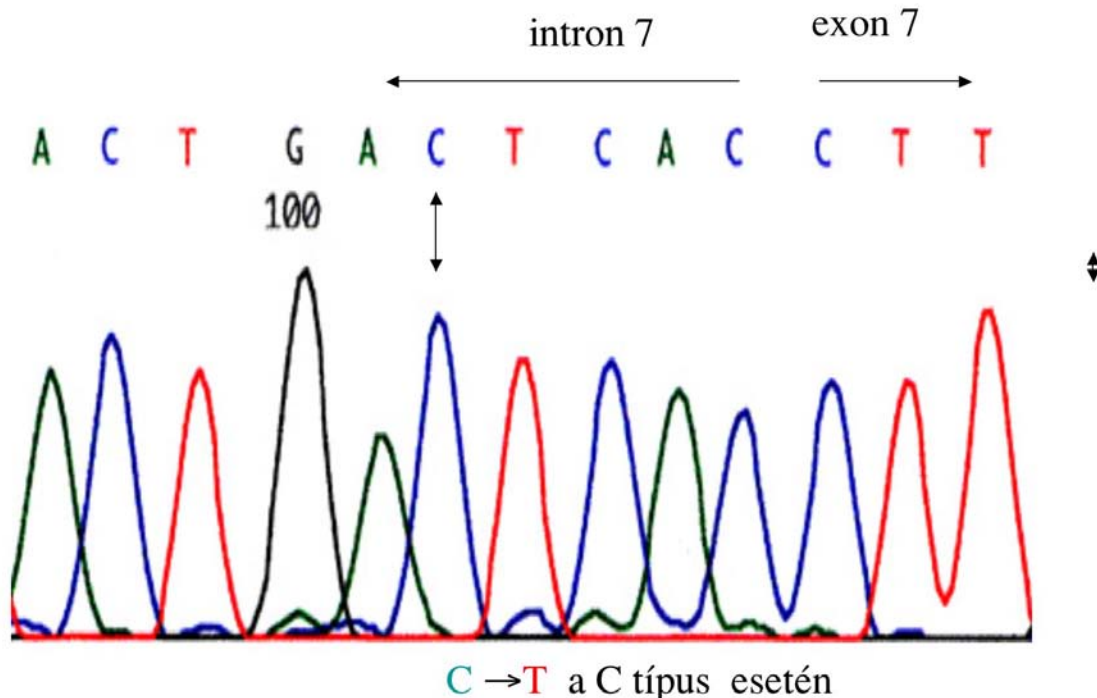
#### **5. 2. 4. 5. Diabetes mellitus [7, 8,28,27]**

A diabetes mellitus 3 formájában (1-es típus, 2-es típus és gestációs) vizsgáltuk a vér kataláz aktivitást. A diabetes mindhárom formájában szignifikánsan ( $p < 0,001$ ) csökkent ( $93,6 \pm 22,2$  MU/l,  $95,8 \pm 17,1$  MU/l, n: 92 és  $73,6 \pm 19,4$  MU/l, n: 60) vér kataláz aktivitásokat találtunk .

A terheseknél [8] a hasonló korú nem terhes nőkhöz viszonyítva csökkent vér kataláz aktivitás detektálható ( $109,2 \pm 13,3$  MU/l, n: 235 vs  $89,1 \pm 18,4$  MU/l, n: 169,  $p < 0,05$ ). A gestációs diabeteses nők vér kataláza még a nem diabeteseseknél, terheseikénél is alacsonyabb ( $73,6 \pm 19,4$  MU/l, n: 60,  $p < 0,05$ ) volt. Ezen utóbbi kataláz csökkenés nem tulajdonítható a terhességi anemianak, mivel a vér hemoglobin a terheseknél ( $120,4 \pm 10,2$  g/l, n: 169), és a gestációs diabeteseseknél ( $118,1 \pm 10,5$ , n: 60) nem mutatott szignifikáns ( $p > 0,2$ ) változást.

A terhesség 2. trimeszterében a vér kataláz szignifikánsan ( $p < 0,05$ ) alacsonyabb ( $62,1 \pm 18,3$  MU/l) mint a 3. trimeszterben ( $80,4 \pm 15,3$  MU/l). A hemoglobin A<sub>1C</sub> viszont a 2. trimeszterben volt magasabb ( $5,7 \pm 0,6\%$ ), mint a 3.-ban ( $5,1 \pm 0,8\%$ ).

Az ismert kataláz gén mutációk [9] nem voltak kimutathatók a terhességi diabeteses egyéneknél.



A kataláz gén 7. exon/intron környezetének nukleotid szekvencia analízise csökkent (41,2 MU/l) vér kataláz aktivitású gesztációs diabeteses betegnél. A 7. intron nyíllal jelzett 5. helyén C nukleotid található (vad típus). A C típusú akatalazémiában ebben a pozícióban T nukleotid található.

A csökkent vér kataláz aktivitás terhességi diabetesben nem növelte a terhességi komplikációk kockázatát. Az anyák közül 53 minden komplikáció nélkül viselte a terhességet, a 7 olyan, aki később szült, mint a közlemény készült, szintén komplikáció nélküli volt.

A gesztációs terheseket két csoportba soroltuk az anyai vér kataláz alapján. A két csoportot elválasztó küszöbérték 60 MU/l volt. A két csoportban a magzati kockázati tényezők összehasonlítását mutatja a következő táblázat:

|                                  | <b>A csoport</b> | <b>B csoport</b> |
|----------------------------------|------------------|------------------|
| Anyai vér kataláz (MU/l)         | 52,3±8,1         | 78,5±10,2        |
| Gesztációs idő (hét)             | 38,7±1,2         | 38,9±1,0         |
| Születési súly (g)               | 3271±473         | 3456±566         |
| Ceasarian sectio (%)             | 33               | 32               |
| Születési súly 3500 g felett (%) | 45               | 50               |
| Respiratory distress syndrome    | 11               | 22               |

A két csoport között szignifikáns eltérés ( $p > 0,05$  minden esetben) nem található, ami arra enged következtetni, hogy a csökkent vér kataláz aktivitás nem növeli a magzati kockázatot.

#### **5. 2. 4. 6. Vitiligo**

A vitiligo, amelynek patomechanizmusában a lehetséges okozók között a szabadgyökök is szerepelnek, a vér kataláz vizsgálata szintén szignifikáns ( $p < 0,001$ ) csökkenést ( $100,2 \pm 17,7$  MU/l, n: 75) mutatott. A csökkent kataláz és a vitiligo tünetei között kapcsolatot nem találtunk.

Ebben a megbetegedésben, hasonlóan a diabetes mellitushoz, az ismert kataláz gén mutációk, amelyek felelősek lehetnek az enzim aktivitásának csökkenéséért, nem voltak kimutathatók.

Nem volt szignifikáns ( $p > 0,07$ ) összefüggés kimutatható a vér kataláz és a vitiligo fennállása, a repigmentizáció, családi halmozódás, vitiligo kiterjedtsége és a Fitzpatrick bőrtípus között.

#### **Irodalom**

1. Vitai M, Góth L. Reference ranges of normal blood catalase activity and levels in familial hypocatalasemia in Hungary. Clin Chim Acta 1997: 261: 35-42. [\[25\]](#)
2. Góth L. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. Clin Chim Acta 1991: 191:143-151. [\[22\]](#)
3. Olafsson T, Olafsson I. Purification of human granulocyte catalase in chronic myeloid leukemia. Biochem Biophys Acta 1977: 482: 301-308.
4. Seghieri G, Simplicio P, Aninchini R, Alving L, De Bellis A, Bennardini F, Franconi F. Platelet antioxidant enzymes in insulin dependent diabetes mellitus. Clin Chim Acta 2001: 309: 19-23.
5. Góth L. Two cases of acatalasemia in Hungary. Clin Chim Acta 1992: 207: 155-158. [\[29\]](#)
6. Góth L. Hypocatalasemia in hospital patients. Clin Chem 1996: 42: 341-342. [\[26\]](#)
7. Góth L, Lenkey A, Bigler NW. Blood catalase and diabetes in Hungary. Diab Care 2001: 10: 1839-1841. [\[28\]](#)
8. Góth L, Tóth Z, Tarnai I, Berces M, Török P, Bigler WN. Blood catalase activity in gestational diabetes: activity is decreased but not associated with pregnancy complications. Clin Chem 2005:51.2401-2404. [\[27\]](#)
9. Góth L, Rass P, Pay A. Catalase enzyme mutations and their association with diseases. Mol Diagn 2004: 8: 141-149. [\[46\]](#)

#### **5. 2. 5 A humán vörösvértest kataláz tisztítása [2,24]**

A kutatásaimhoz szükségesnek tartottuk összehasonlítási célból tisztított humán eredetű kataláz enzimet felhasználni. Az 1980-as és az 1990-es években a kereskedelemben kizárólag csak marhamáj kataláz volt vásárolható tisztított formában (Sigma, Boehringer és Reanal).

Ezért úgy döntöttünk, hogy humán vörösvértestekből készítünk tisztított kataláz enzimet. Ehhez Mörkoffer-Zweiz [1] eljárását módosítottam és a következő lépésekből álló eljárást dolgoztam ki [2].



A vörösvértestek hemolízise (desztillált vízzel, fagyasztással), a sejt törmelék eltávolítása centrifugálással, majd dialízis után a kataláz megkötése DEAE cellulóz ioncserélőn. A hemoglobin elúciója után a kataláz elúciója 60 mmol/l foszfát puferral (pH: 6.8). Ezután a pH-t 4,8-ra állítottuk, és éjszakán át desztillált vízzel szemben dializáltuk, majd a kicsapódott fehérjéket centrifugálással eltávolítottuk.

Ezután CM-Sephadexet tartalmazó kromatográfiás oszlopra vittük fel a kataláz tartalmú oldatot. Az oszlopot 4,8 pH-jú foszfát pufferrel mostuk, majd a katalázt foszfát puferral (pH 6,2) eluáltuk.

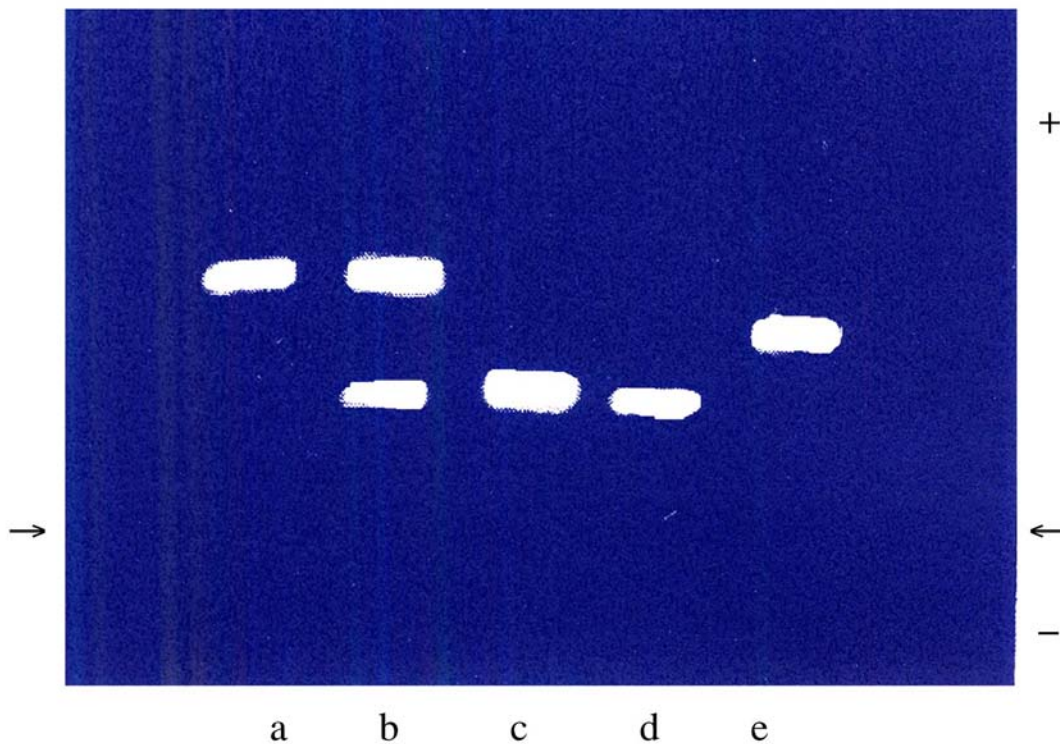
Az eluátumból a katalázt etanollal és ammónium-szulfáttal eltávolítottuk, és oldás után tovább tisztítottuk Sephadex G-150 és Sepharose-6B gélkromatográfiával.

#### A tisztított humán kataláz és tisztított marhamáj kataláz összehasonlítása

| <b>Paraméter</b>                           | <b>Humán vörösvértest</b> | <b>Marhamáj (SIGMA)</b> |
|--|---------------------------|-------------------------|
| Elektroforetikus mobilitás                 | 0,855                     | 1,0                     |
| Mw (kDa)                                   | 280                       | 241                     |
| pI (pH)                                    | 5,88                      | 5,69                    |
| E405/280                                   | 1,2                       | 1,18                    |
| Abszorpciós csúcs (nm)                     | 407,8/508,5/539,8/629,1   | 405,6/502,0/540,6/629,3 |
| Specifikus aktivitás x 10 <sup>4</sup> U/g | 20,6                      | 1,4                     |

A fenti eredmények azt mutatják, hogy a vörösvértest kataláz több tekintetben hasonló tulajdonságú, mint a marhamáj kataláz, de néhány jellemzőjében (elektroforetikus mobilitás, molekulatömeg) eltérés tapasztalható.

A tisztított termék minőségét jellemző paraméter (E405/280, specifikus aktivitás) a vörösvértest kataláznál jobbnak mutatkozott, mint a kereskedelmi forgalomból beszerzett, tisztított marhamáj kataláznál.

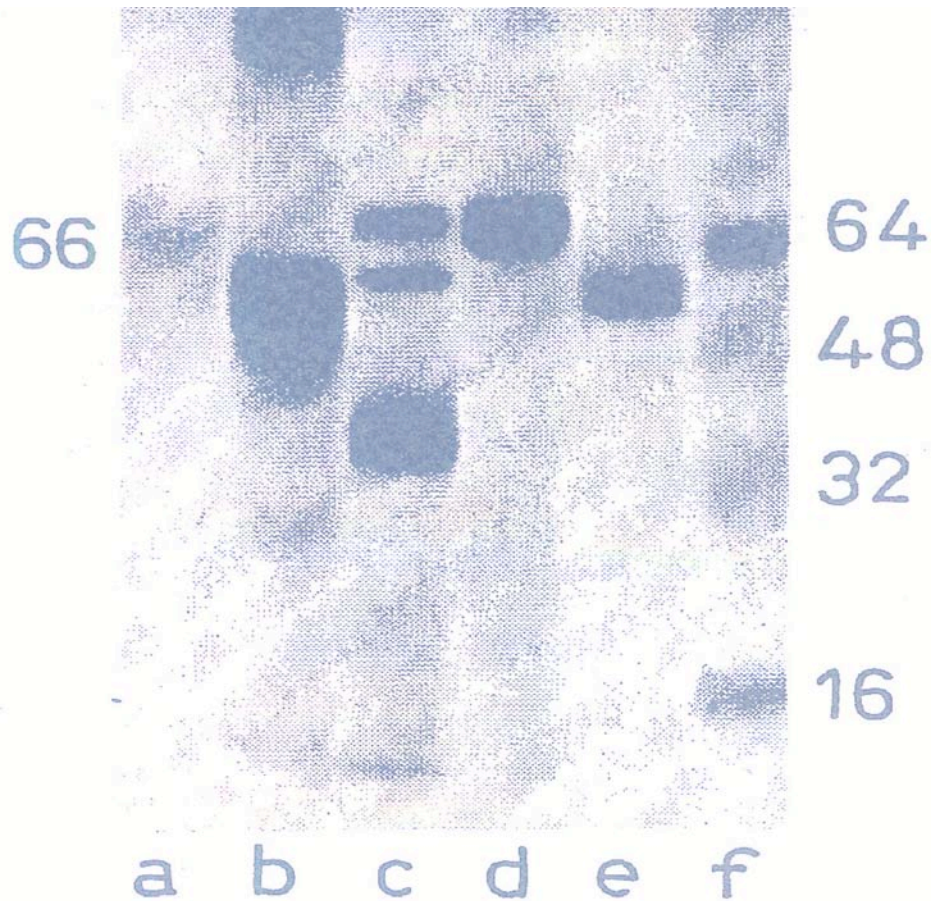


Kataláz készítmények elektroforetikus mobilitása.

a: marhamáj kataláz (SIGMA), b: marhamáj kataláz + szérum, c: szérum kataláz,  
d: szérum kataláz + tisztított humán vörösvértest kataláz, e: tisztított humán  
vörösvértest kataláz

Az elektroforetikus mobilitás alapján a humán szérum és a tisztított vörösvértest, illetve marhamáj kataláz három különböző mobilitású kataláz sávot definiált.

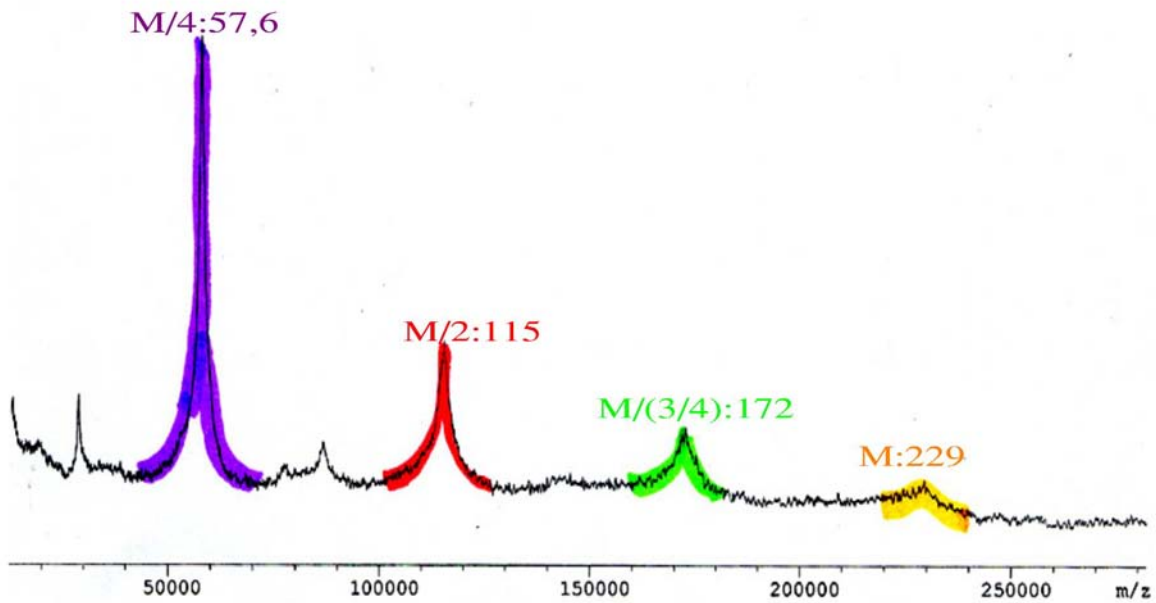
A marhamáj és a szérum kataláz teljesen eltérőek, mivel keverékükben is két külön sávként jelennek meg. A szérum és vörösvértest kataláz keveréke ettől eltérően egy sávot mutat, amely a reverzibilisen egymásba alakíthatóságukat jelzi, mint ezt korábban tárgyaltuk.



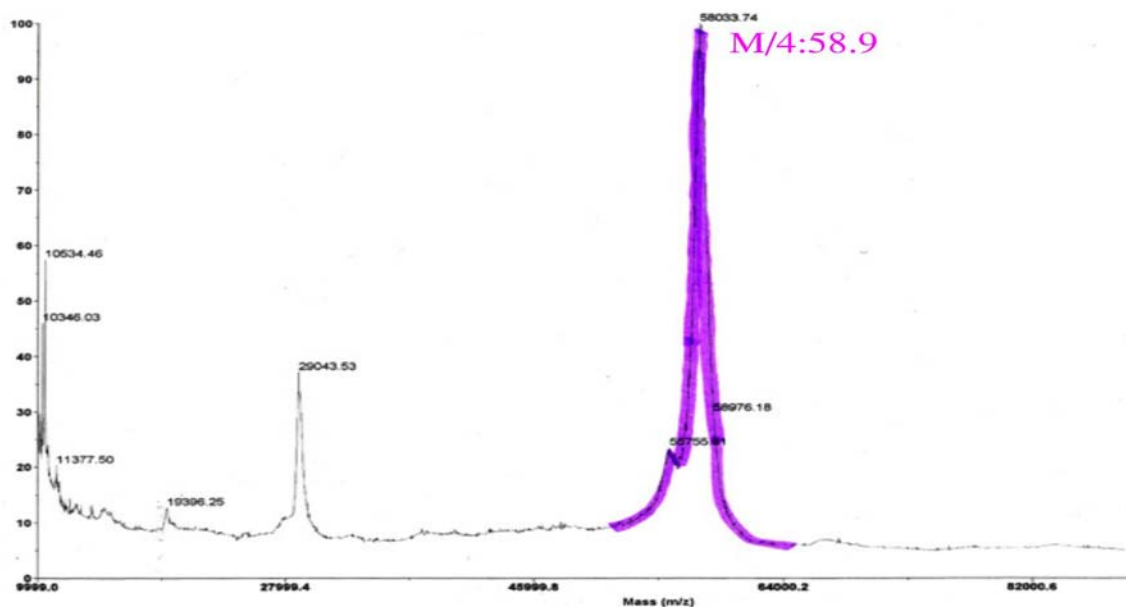
A különböző kataláz alegységek molekulatömegének meghatározása SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel.

a és f: molekulatömeg markerek, b: kataláz DEAE kromatográfia után, d: kataláz CM kromatográfia után (70 kDa), e: marhamáj kataláz (SIGMA, 60 kDa).

Az általam tisztított humán vörösvértest kataláz, és a kereskedelemben forgalmazott marhamáj kataláz alegységek molekulatömegének meghatározását elvégeztük napjaink korszerű eljárásaival (MALDI-TOF tömegspektrometria és a mikro-kapilláris (chip) elektroforézis) is.



Tisztított marhamáj kataláz MALDI spektruma  
 M a 4 alegységből álló tetramer, M/ (3/4) trimer, M/2 dimer, M/4 monomer és a molekula nagysága kDa-ban

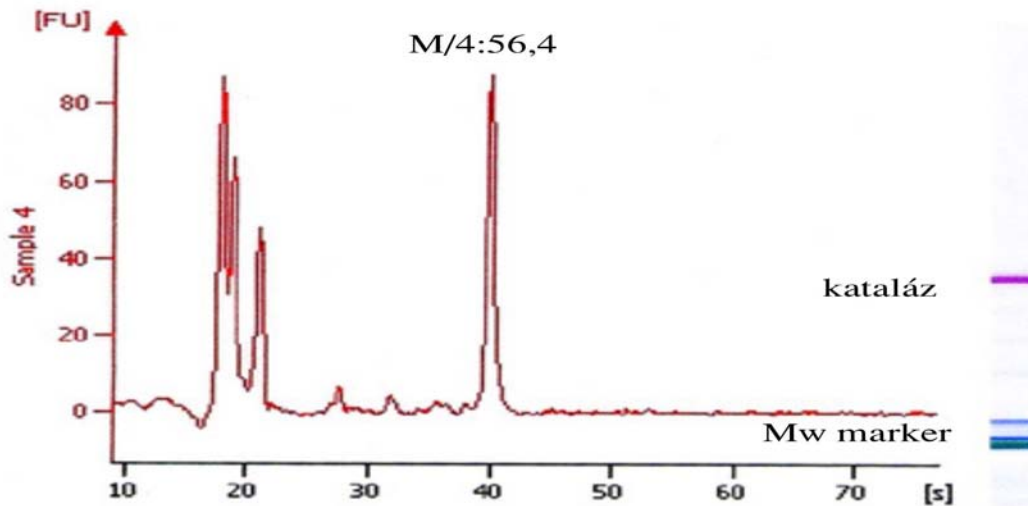


Tisztított humán vörösvértest kataláz MALDI-TOF spektruma.  
 Az M/4 a kataláz alegység (monomer) 58,9 kDa nagyságú.

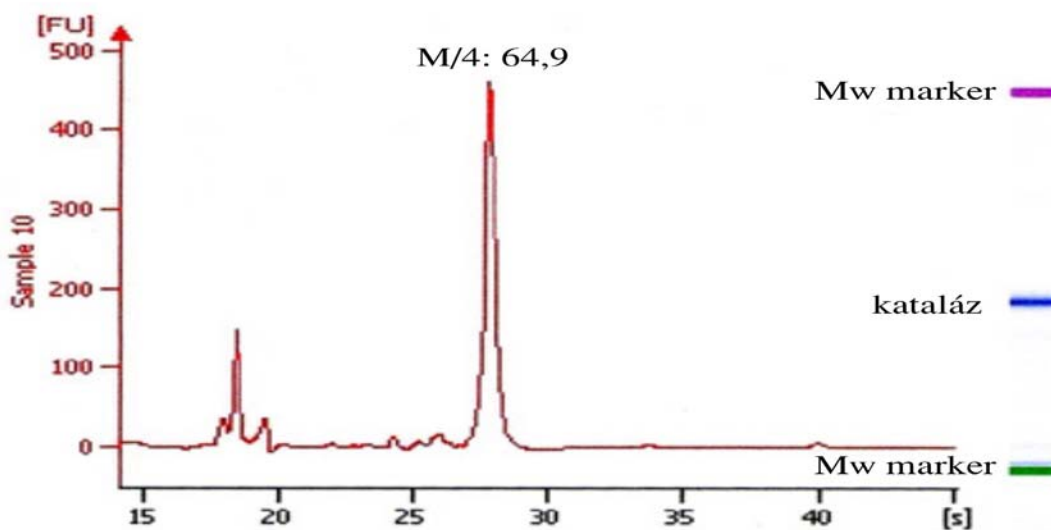
Ezen kataláz molekulák molekulatömegének meghatározását mikro-kapilláris elektroforézissel is elvégeztük. A minta kezelése itt is az enzimnek alegységekre történő disszociációját eredményezte.

A következő ábrákon a kapilláris elektroforézissel nyert elektroforetogramok láthatók.

Az ábrák jobb oldalán a fluoreszcensen jelzett molekulatömeg markerek és a kataláz sáv, míg középen a fluoreszcens jel-retenciós idő segítségével kiértékelt elektroforetogram látható.



Marhamáj kataláz kapilláris elektroforézise



Tisztított vörösvértest kataláz kapilláris elektroforézise

Az újabb vizsgálatok tükrében az általam tisztított humán vörösvértest és marhamáj kataláz (SIGMA) összehasonlítását mutatja a következő táblázat.

|                           | Vörösvértest kataláz | Marhamáj kataláz |
|---------------------------|----------------------|------------------|
| Elektroforetikus migráció | 0,86                 | 1                |
| Molekulatömeg kDa         |                      |                  |
| SDS-Page                  | 69                   | 60               |
| Kapilláris (chip)         |                      |                  |
| Agilent                   | 64,9                 | 56,4             |
| BioRad                    | 58                   | 50               |
| MALDI                     | 58,9                 | 57,6             |
| Irodalom                  | 55,5-64              | 60               |
| OxisResearch              | 64                   | 61,7             |
| Aminosav                  | 527                  | 506              |

## Irodalom

1. Mörikoffer-Zwey S, Cantz M, Kauffman H, Wartburg PJ, Aebi H. Heterogeneity of erythrocyte catalase. Eur J Biochem 1969; 11: 49-57.
2. Góth L. Human erythrocyte catalase, Isolation with an improved method, Characterization and comparison to bovine liver catalase. Enzyme 1989; 41: 191-199. [24]
3. Catalase, Human Erythrocyte. Cat No.25432. OxisResearch. Portland, Oregon, USA.

## 5. 3. A MAGYARORSZÁGI AKATALAZÉMIA

### 5. 3. 1. A Magyarországi akatalazémia/hypokatalazémia felfedezése [1-8,22,25,30,32,31,46,4]

A spektrofotometriás vér kataláz meghatározási módszer és a referens tartomány birtokában [1, 2] vállalkoztunk arra, hogy elsőként Magyarországon, veleszületett katalázhiányos egyéneket keressünk, és ezek klinikai, klinikai kémiai, molekuláris genetikai vizsgálatát elvégezzük.

A vér kataláz vizsgálatokat 1989-ben kezdtük és folytattuk 1992-ig a következő módszerrel:

- a. A Sümegi Városi Kórházba felvételre került összes betegnél elvégeztük a kataláz mérést. A 350 ágyas kórház (belgyógyászat, sebészet, ideg-elme, szülészet) 80 ágyas belgyógyászati osztályának felvevő területe a korábbi sümegi, illetve a későbbi tapolcai járás, Zala megyétől a Balaton felvidéken át egészen Balatonfüredig, míg a 160 ágyas Ideg-Elme osztályé a teljes Veszprém megye.
- b. A Városi Rendelőintézetből és a környező családi orvosoktól laboratóriumi vizsgálatokra (vérkép) érkező véreket is bevontuk a programba. Ez a két csoport 18 222 egyén vér kataláz vizsgálatát jelentette, akiknek életkora 12 és 98 év között változott, és 52,6% volt a nők aránya, míg a férfiaké 47,4%.



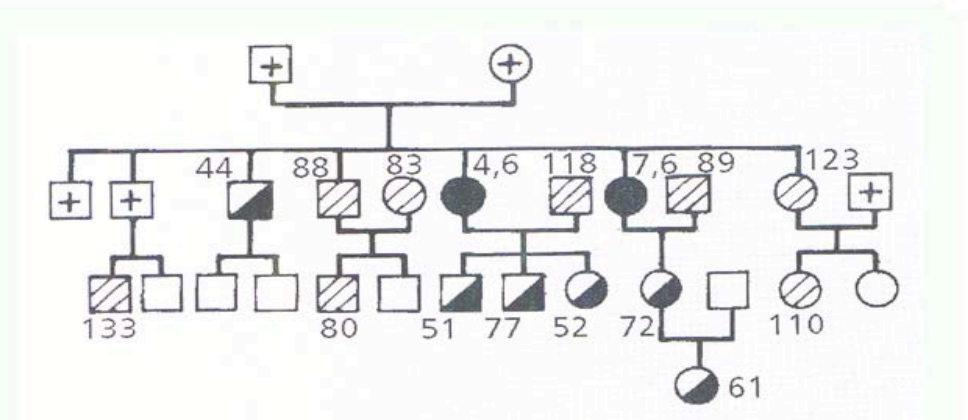
- c. 1991-ben a vér kataláz referens tartományok meghatározásakor részletesen ismertetett Sümeg környéki, kis lélekszámú falvakban történt komplex egészségügyi vizsgálat során laboratóriumi vizsgálatra érkezett 3 300 lakos vér katalázát is meghatároztuk.
- d. A Sümegi Rendelőintézetbe egészségügyi vizsgálatra beutalt munkavállalók, továbbtanulók, sportolók közül a vizsgálati időszakban 1 630-nak mértük a vér kataláz aktivitását.

Az a-d csoportok 22 152 tagja 14 és 96 év közötti, és 54,1%-uk nő, míg 45,9%-uk férfi volt [3].

Az első akatalazémiát a 1989-ben a belgyógyászati osztályon fekvő, az 1961.-ként vizsgált betegnél detektáltuk, akinek vér kataláza 4,6 MU/l, ami a referens átlag 4,0%-ának felel meg.

A második akatalazémiás egyént 1991-ben, szintén a belgyógyászati osztályon fekvő, az 15 297. vizsgált betegként találtuk, akinek vér kataláza 7,6 MU/l, ami a referens átlag 6,7%-a. A részletes anamnesis derítette ki, hogy a két nőbeteg, akik különböző asszonynéven szerepeltek, valójában testvérek.

Ezután a család többi tagját is bevonva a vizsgálatokba, tudtuk megrajzolni a vér katalázra vonatkoztatott családfát.



A magyarországi első akatalazémiás család pedigréje. A szimbólumok melletti számok a vér kataláz aktivitását mutatják, a szimbólumoknál +: az elhalt családtag, üres: nem vizsgált, teljesen sötét: akatalazémiás, félig sötét: hypokatalazémiás, vonalazott: normokatalazémiás

A magyarországi akatalazémiás családon kívül további 12 hypokatalazémiás családot derítettünk fel. Ehhez a szűrővizsgálat során hypokatalazémiás egyéneket családokhoz rendeltük, majd kikerestük az eredmények közül a család többi tagjának kataláz aktivitását. Az egyes egyének és a családok relációinak megállapítására a kórházban dolgozó és a különböző településeken lakó munkatársak segítségét kértük. Ez az aránylag kis lélekszámú településeken könnyen megoldható volt. Ezután a család többi tagját is

önkéntesen, írásbeli nyilatkozat alapján, a családi orvos segítségével vontuk be a vizsgálatba.

A vér kataláz szűrővizsgálat révén detektáltunk 1 akatalazémiás (K) családot, 2 akatalazémiás nővérrel, 6 hypokatalazémiás és 9 normokatalazémiás családtaggal.

A szűrővizsgálattal felderített 12 hypokatalazémiás családhoz még egy család (E) került, amelyet az ország keleti régiójában vitiligos betegek vizsgálatakor találtunk. A hypokatalazémiások csoportjába összesen 64 egyént soroltunk, és a 14 veleszületett katalázhiányos családban 68 normokatalazémiás családtagot regisztráltunk.

Akatalazémiás és hypokatalazémiás családok vér kataláz aktivitásai ( $x \pm SD$ , n)  
Magyarországon [3-5,30,29,32]

| Szám            | Azonosító | Akatalazémiás  |          | Hypokatalazémiás |           | Normokatalazémiás |           |
|-----------------|-----------|----------------|----------|------------------|-----------|-------------------|-----------|
|                 |           | Átlag SD       | n        | Átlag SD         | n         | Átlag SD          | n         |
| 1               | K         | 6,1±2,1        | 2        | 57,6±11,5        | 6         | 101,7±19,3        | 9         |
| 2               | G         |                |          | 52,9±17,9        | 8         | 108,9±20,7        | 12        |
| 3               | M         |                |          | 44,0±8,1         | 9         | 100,1±4,5         | 7         |
| 4               | D         |                |          | 54,0±10,3        | 6         | 102,2±13,4        | 7         |
| 5               | T         |                |          | 56,1±13,2        | 3         | 95,6±3,5          | 5         |
| 6               | Ne        |                |          | 65,5±0,7         | 2         | 96,3±5,5          | 3         |
| 7               | V         |                |          | 62,3±18,6        | 5         | 90,3±0,4          | 2         |
| 8               | Cs        |                |          | 66,3±8,7         | 4         | 106,9±11,0        | 4         |
| 9               | Ny        |                |          | 72,7±2,9         | 4         | 100,6±15,1        | 3         |
| 10              | P         |                |          | 73,0±4,7         | 5         | 95,3±7,2          | 6         |
| 11              | S         |                |          | 62,6±15,2        | 3         | 92,4±6,4          | 2         |
| 12              | Gy        |                |          | 60,5±10,0        | 3         | 96,3±5,7          | 5         |
| 13              | H         |                |          | 63,9±9,4         | 2         | 115,3             | 1         |
| 14              | D         |                |          | 66,9±7,1         | 2         | 108,1±2,1         | 3         |
| <b>Összesen</b> |           | <b>6,1±2,1</b> | <b>2</b> | <b>61,3±9,9</b>  | <b>64</b> | <b>100,7±9,6</b>  | <b>68</b> |

### 5. 3. 2. Az öröklődő katalázhiány klinikai jellemzői [3-8,30,29,32,31,46,4]

#### 5. 3. 2. 1. A nemek aránya

A veleszületett katalázhiányos családok nemek szerinti megoszlása a következő.



|                         | Nő |      | Férfi |      | Összesen |
|-------------------------|----|------|-------|------|----------|
|                         | N  | %    | N     | %    | N        |
| Akatalazémiások         | 2  | 100  | 0     | 0    | 2        |
| Hypokatalazémiások      | 39 | 60,9 | 25    | 39,1 | 64       |
| Normokatalazémiások     | 28 | 37,9 | 40    | 62,1 | 68       |
| Akatalazémiások (Japán) | 49 | 52,1 | 43    | 47,9 | 92       |
| Akatalazémiások (Svájc) | 5  | 45,4 | 6     | 54,6 | 11       |

Magyarországon a katalázhiányos nők aránya jelentősen magasabb 1,63 :1, mint a férfiaké.

#### 4. 3. 2. 2. A veleszületett katalázhiány földrajzi lokalizációja

Az első katalázhiányos egyének a Nyugat Dunántúli vizsgálati területen élő lakosok voltak.

Bár az M család tagjai is ebben a régióban élnek, de a proband születése helye Erdély, a Nagyvárad melletti Pécska község, ahonnan a II. világháború alatt költözött ide és telepedett le, míg testvérei és szülei ma is Nagyvárad mellett élnek.

A D család, amelynek egy tagja vitiligóban szenved, a vitiligos betegek vizsgálatakor került detektálásra. Ez a család Hajdú-Bihar megyében él.

#### 5. 3. 2. 3. A veleszületett katalázhiány gyakorisága Magyarországon

Vizsgálataink során további akatalazémiás egyéneket nem találtunk, így ezen adatokból számolva az akatalazémia gyakorisága Magyarországon 0,05/1000.

A hypokatalazémia magyarországi gyakorisága 0,18/1000.

Összegezve, a Magyarországon élő veleszületett katalázhiány mintegy 2 300 lakost érinthet.

#### 5. 2. 3. 4. A veleszületett katalázhiányos egyének betegségei és életkora

1989-től 2004-ig a következő elváltozásokat tapasztaltuk a veleszületett katalázhiányos egyéneknél, kivéve a diabetes előfordulását, amelyet külön részben vizsgáltunk.

Az első akatalazémiás nő 62 éves korában exitált (1991). A halál oka adenocarcinoma coli és ennek szövődményei voltak. A különböző tumorok csökkentik a vér kataláz aktivitást, de ennek hozzájárulása a kataláz csökkenéshez jóval kisebb mértékű [9].

A hypokatalazémiások közül 1989 óta elhalálozott 4 személy, akiknél a sectio a következőket találta:

- a. hypokatalazémiás nő, élt 73 évet: arteriosclerosis universalis,

- b. hypokatalazémiás férfi élt 73 évet: cerebrovascularis lesio,
- c. hypokatalazémiás férfi élt 46 évet: diabetes komplikációi,
- d. hypokatalazémiás férfi élt 77 évet: prostata carcinoma.

Mind az öt betegnél a sectio során az életkorukhoz viszonyított, fokozott mértékű arteriosclerosis volt látható az erekben.

A hypokatalazémiások közül egy scizophreniában szenved.

A Takahara tünetre utalás egy esetben történt, míg a többi személynél nem volt megtalálható.

Az átlagéletkor a katalázhiányos egyéneknél  $45,1 \pm 19,3$  év (n: 61, 6-86 év), ami valamivel magasabb, mint ugyanezen családok normokatalazémiás családtagjaié, amely  $42,1 \pm 18,5$  év (n: 66, 7-77 év).

A veleszületett katalázhiányos családok akatalazémiás/hypokatalazémiás tagjai élik a szokásos magyar lakosok életét, katalázhiányra utaló jelekről vagy a katalázhiányról a vizsgálat kezdetéig nem volt tudomásuk.

### **5. 2. 3. 5. A katalázhiány és a diabetes mellitus [5,10,32,28]**

Az első és a második akatalazémiás nőnél a 2-es típusú diabetes az anamnézisben már szerepelt. Ez adta az indítékot, hogy ezzel a kérdéssel részletesebben foglalkozzunk, bár az irodalomban erre vonatkozó adatot nem találtunk.

A magyarországi kataláz szűrés életkortól függetlenül a régió minden felnőtt lakosára kiterjedt, így lehetőség volt a diabetes mindkét fő típusának tanulmányozására veleszületett katalázhiányban.

A diabetes gyakorisága a veleszületett katalázhiányban 12,1% (8/66), az akatalazémiában 100% (2/2), hypokatalazémiában 9,4% (6/64).

Egy budapesti felmérés szerint a diabetes gyakorisága Magyarországon 1,75% (1049/60 000) [5, 11].

A veleszületett katalázhiányban a 2-es típus a domináló (7/8: 87,5%).

A nők aránya ebben a típusban 100% (7/7), míg a magyarországi diabetes regiszterben ez jóval kevesebb, azaz 60,5%.

A diabetes felismerése a katalázhiányosoknál átlagosan a 41,6. évben történt, míg ez a hazai regiszter szerint magasabb, 56,3 év. Kiemelendő az a két hypokatalazémiás, akiknél már 35, illetve 36 évesen manifesztálódott a diabetes.

A klinikai vizsgálati eredmények a veleszületett katalázhiányos családokban:

|                                     | <b>Akatalazémia</b> | <b>Hypokatalazémia</b>                           | <b>Normokatalazémia</b> |
|-------------------------------------|---------------------|--|-------------------------|
|                                     | N: 2                | N: 64  | N: 68                   |
| Nem diabeteses                      | 0                   | 58   | 68                      |
| Diabeteses:                         | 2 (100%)            | 6 (9,4%)   | 0 (0%)                  |
| 1-es típus                          | 0                   | 1 (Férfi)  | 0                       |
| 2-es típus                          | 2 (Nő)              | 5 (Nő)   | 0                       |
| Diabetes felismerési életkora (év): |                     |  |                         |
| 1-es típus                          | --                  | 7  | --                      |
| 2-es típus                          | 52, 51              | 35, 36, 40, 41, 56                               | --                      |
| Exitált:                            |                     |  |                         |
| 1-es típus                          |                     | 1  |                         |
|                                     |                     | 46 évesen: diabetes<br>komplikációi              |                         |
| 2-es típus                          | 1                   | 1  |                         |
|                                     | 62 évesen tumor     | 73 évesen:<br>arteriosclerosis                   |                         |
| Inzulin                             | csökkent: 1         | csökkent: 3<br>nem változott: 1<br>emelkedett: 1 |                         |
| C-peptid                            | csökkent: 1         | csökkent: 4<br>nem változott: 1                  |                         |

Az inzulin csökkent az vizsgált 6 eset közül 4 esetben, míg a C-peptid 5 esetben csökkent.

### **5. 3. 3. Az öröklődő katalázhiány biokémiai jellemzői**

#### **5. 3. 3. 1. A hidrogénperoxid metabolizmus további enzimei [5,32]**

A veleszületett katalázhiány a szervezet megnövekedett hidrogénperoxid koncentrációját eredményezi. A hidrogénperoxid metabolizmus két további enzimének, a hidrogénperoxidot produkáló szuperoxid dizmutáz és a szintén hidrogénperoxidot fogyasztó glutationperoxidáz aktivitása fontos lehet ezeknél az egyéneknél.

A veleszületett katalázhiányos egyéneknél a szuperoxid dizmutáz aktivitás szignifikánsan ( $p < 0,001$ ) emelkedett (katalázhiányos:  $1683 \pm 359$  U/gHb vs normokatalazémiás:  $1094 \pm 276$  U/gHb, n: 16).

A glutationperoxidáz, amely aktivitásának jelentős növekedését vártuk volna, a hidrogénperoxid detoxifikálására mindössze mintegy 10%-os, nem szignifikáns ( $p > 0,05$ ) növekedést mutatott (katalázhiányos:  $45,0 \pm 17,0$  U/gHb vs normokatalazémiás  $40,7 \pm 18,8$  U/gHb, n:16).

### 5. 3. 3. 2. A szénhidrát és lipid metabolizmus paramétereit [12,37]

A vizsgálat során 1 akatalazémiás, 27 hypokatalazémiás (nem diabeteses) és 28 nemben, korban hasonló (match-paired) normokatalazémiás családtag laboratóriumi paramétereit hasonlítottuk össze, mint ezt a következő táblázat mutatja.

| Szénhidrát metabolizmus      |                  |                   |       |          |
|------------------------------|------------------|-------------------|-------|----------|
| Paraméter                    | Hypokatalazémiás | Normokatalazémiás | p     | Referens |
| Glükóz mmol/l                | 5,40±1,02        | 5,10±0,69         | 0,193 | 3,6-6,0  |
| Fruktózamin µmol/l           | 216,1±28,2       | 214,1±17,1        | 0,705 | <285     |
| Hemoglobin A <sub>1C</sub> % | 5,40±1,01        | 5,10±0,69         | 0,225 | 4,2-6,1  |

A táblázat adatai a szénhidrát metabolizmus mindhárom paraméterénél a hypokatalazémiások esetében kedvezőtlenebb, a diabetes felé mutató értékeket tartalmaznak, azonban a 6%-ot nem meghaladó növekedések nem szignifikánsak (p>0,193).

| Lipid metabolizmus            |                  |                   |        |                        |
|-------------------------------|------------------|-------------------|--------|------------------------|
| Paraméter                     | Hypokatalazémiás | Normokatalazémiás | p      | Referens/<br>Kívánatos |
| Triglicerid mmol/l            | 2,35±1,28        | 2,24±1,26         | 0,758  | <1,7                   |
| Koleszterin mmol/l            | 5,58±0,97        | 4,56±0,89         | 0,001  | <5,2                   |
| LDL-koleszterin mmol/l        | 3,44±0,96        | 2,83±0,97         | 0,003  | <3,4                   |
| HDL-koleszterin mmol/l        | 1,42±0,30        | 1,38±0,39         | 0,664  | >1,2                   |
| Apo A1 g/l                    | 1,76±0,10        | 1,51±0,38         | 0,003  | >1,15                  |
| Apo B b/l                     | 1,29±0,25        | 1,05±0,23         | 0,001  | <1                     |
| Lp(a) mg/l                    | 368,7±214,0      | 212,1±193,8       | 0,048  | <300                   |
| LDL oxidatív rezisztencia sec | 4130±1467        | 5441±1828         | 0,020  |                        |
| Életkor év                    | 44,7±19,9        | 42,7±17,8         | 0,778  |                        |
| Kataláz MU/l                  | 48,9±15,8        | 106,3±18,5        | <0,001 |                        |

A hypokatalazémiás egyének összkoleszterin, LDL-koleszterin, Lp(a), Apo B koncentrációi és az LDL oxidációval szembeni stabilitása a nem kívánt irányban szignifikánsan megváltozott. Az Apo A1 koncentráció szignifikáns növekedése talán kisebb mértékű védelemre utal, mint ezt a táblázat szemlélteti.

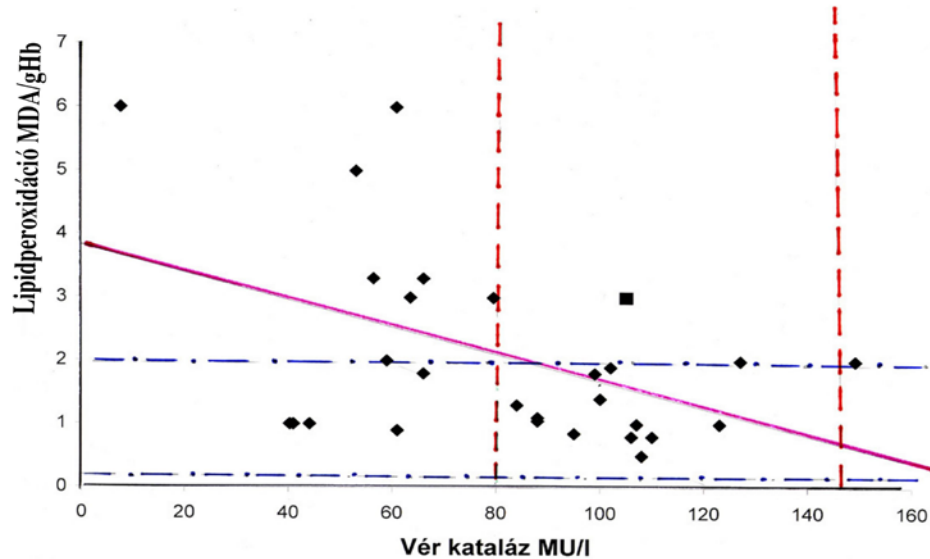
### 5. 3. 3. 3. A lipid peroxidáció és a karbonil képződés

A hidrogénperoxid további oxidációs hatásának vizsgálatára mértük a plazma lipidperoxidációt és a fehérje karbonil (csoport) koncentrációt.

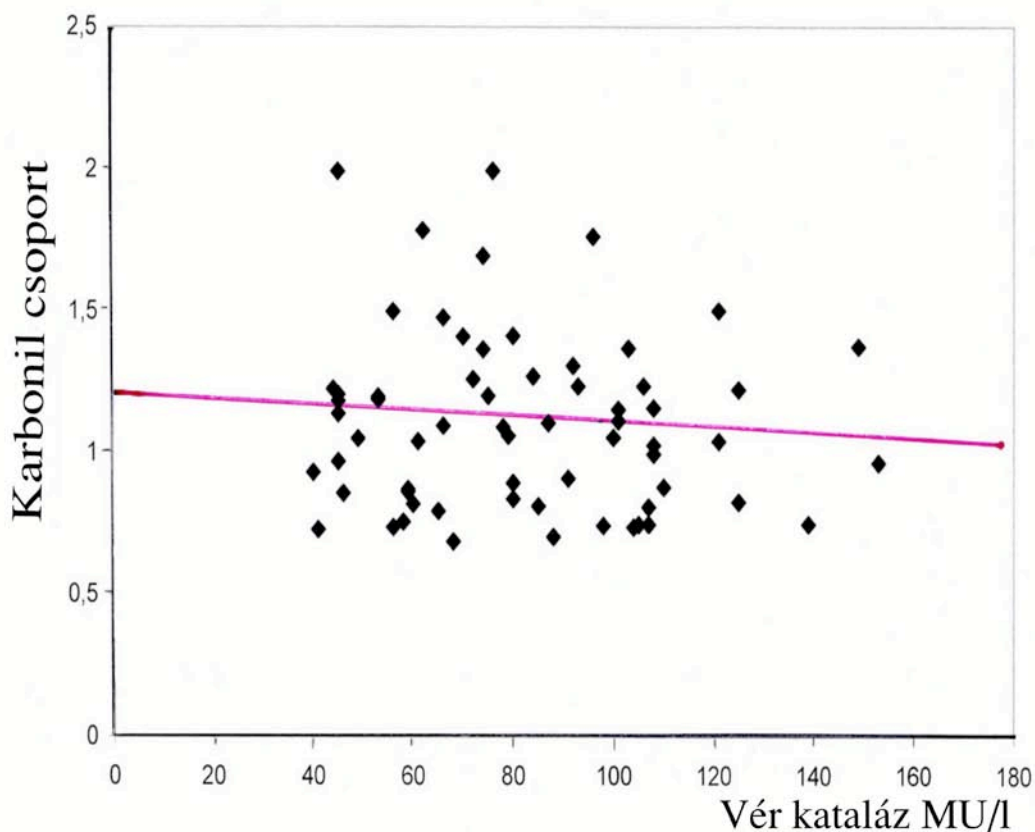
A két paraméter kapcsolatát a veleszületett kataláziával a következő ábrák mutatják.

Az ábra adatai azt mutatják, hogy a vér kataláz aktivitással fordítottan arányos a lipidperoxidáció.

A hypokatalazémiások (n: 13) átlagos lipidperoxidációja, amelyet úgy határoztunk meg, hogy a hozzáadott hidrogénperoxid eredményeként képződött malondialdehidet mértük, szignifikánsan ( $p=0,0065$ ) magasabb, mint a normokatalazémiás családtagoké ( $2,44\pm 1,07$  MDA/ gHb vs  $1,38\pm 1,07$ , n: 15).



A lipidperoxidáció és a vér kataláz összefüggése hypokatalazémiás családoknál ( $y = -0,218 + 3,849x$ ,  $r: -0,451$ , n: 28). A regressziós egyenes a folytonos vonal, a lipidperoxidációs kapacitás és vér kataláz referens tartományának alsó és felső határai szaggatott vonallal jelölve.



A karbonil csoport koncentráció és a vér kataláz összefüggése  
 $y = -0,001 + 1,192x$ ,  $r = -0,093$ ,  $n = 66$

A fehérje karbonil koncentráció a vér kataláz aktivitással nem mutatott összefüggést. A 34 hypokatalazémiás és 32 normokatalazémiás átlagos karbónium koncentrációja ( $1,16 \pm 0,34$ ) mintegy 10,5%-al magasabb, mint a 32 normokatalazémiásé ( $1,05 \pm 0,26$ ), de ez az emelkedés nem szignifikáns ( $p = 0,159$ ).

#### 5. 3. 3. 4. A kataláz protein és szöveti kataláz aktivitás [13,36]

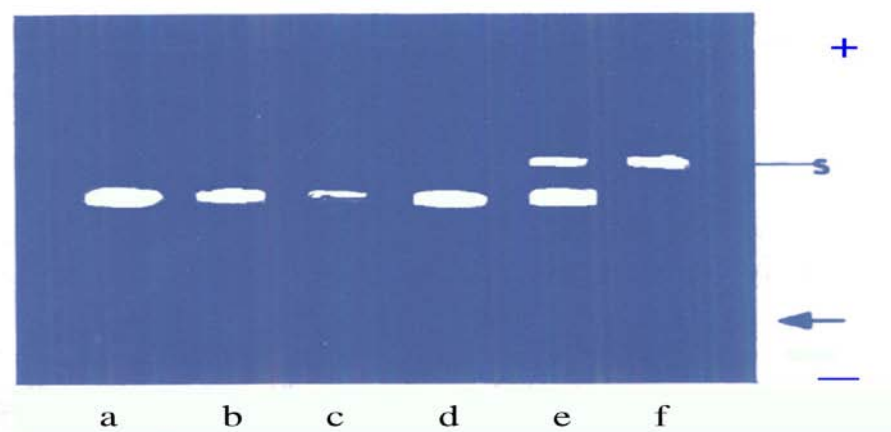
A kataláz protein elektroforetikus mobilitását és izoelektromos pontját vizsgáltuk a katalázhiányos egyének családjában, és a következő eredményeket kaptuk.

A kataláz fehérje elektroforetikus vándorlása és izoelektromos pontja veleszületett katalázhiányban

| Egyén                 | Kataláz MU/l | Elektroforetikus vándorlás: mm | pI: pH    |
|-----------------------|--------------|--------------------------------|-----------|
| 1. Akatalazémiás      | 5,0          | 29,9                           | 6,03      |
| 2. Akatalazémiás      | 7,6          | 29,7                           | 6,04      |
| 3. Hypokatalazémiás   | 50,8         | 29,8                           | 6,04      |
| 4. Hypokatalazémiás   | 66,3         | 29,4                           | 6,01      |
| 5. Hypokatalazémiás   | 44,1         | 30,2                           | 6,03      |
| 6. Hypokatalazémiás   | 75,3         | 29,9                           | 6,01      |
| Összes A              |              | 29,81±0,26                     | 6,02±0,01 |
| 7. Normokatalazémiás  | 88,3         | 29,8                           | 5,98      |
| 8. Normokatalazémiás  | 83,0         | 30,1                           | 5,98      |
| 9. Normokatalazémiás  | 133,2        | 29,8                           | 6,02      |
| 10. Normokatalazémiás | 110,0        | 29,9                           | 6,01      |
| Összes N              |              | 29,9±0,14                      | 6,00±0,02 |
| Referens (n: 10)      | 115,5        | 30,0±0,20                      | 6,01±0,02 |

A táblázat adatai alapján látható, hogy az elektroforetikus mobilitásban nincs szignifikáns különbség a katalázhiányos vs normokatalazémiás családtagok (p: 0,584) és a kontroll egyének (p: 0,394) között.

Hasonlóan alakult az izoelektromos pontok közötti nem szignifikáns (p>0,26) különbség.



A különböző vér katalázok elektroforetikus mobilitása: a: normokatalazémia, b: hypokatalazémia, c: akatalazémia, d: normokatalazémia, e: normokatalazémia + Svájci típusú akatalazémia (S), f: Svájci típusú akatalazémia.

Szöveti specifikus kataláz aktivitás (U/mg fehérje), elektroforetikus mobilitás és pI akatalazémiában (Akat) és kontrolloknál (Kont)

| Szerv        | Specifikus aktivitás<br>U/mg |       | Elektroforetikus mobilitás<br>mm |      | Izoelektromos pont<br>pH |      |
|--------------|------------------------------|-------|----------------------------------|------|--------------------------|------|
|              | Akat                         | Kont  | Akat                             | Kont | Akat                     | Kont |
| Máj          | 65,4                         | 431,6 | 30,5                             | 29,4 | 5,95                     | 6,06 |
| Pancreas     | 14,8                         | 119,3 | 30,1                             | 30   | 5,96                     | 5,99 |
| Vese         | 37,7                         | 289,2 | 29,9                             | 29,8 | 5,96                     | 5,98 |
| Tüdő         | 60,1                         | 446,3 | 29,6                             | 29,7 | 6,03                     | 6,02 |
| Lép          | 52,9                         | 344,5 | 29,4                             | 29,8 | 6,01                     | 5,97 |
| Vér (U/mgHb) | 42,1                         | 839,2 | 29,9                             | 30   | 6,03                     | 6,01 |

Az egyes szövetekben a kataláz aktivitás 12,4% (pancreas) és 15,3% (lép) között változott, és legalacsonyabb a vér kataláz aktivitás (5%).

### 5. 3. 3. 5. A katalázhiány és krónikus hemolízis [14,35]

A veleszületett katalázhiány révén megnövekedett hidrogénperoxid koncentráció okozhatja-e a vörösvértestek krónikus hemolízisét? Ennek a kérdésnek a megválaszolására vizsgáltuk a hemolízis vér és szérum paramétereit két akatalazémiás, 8 hypokatalazémiás egyénnél.

#### Hemolízis markerek katalázhiányban

| Hemolízis marker           | Akatalazémia+hypokatalazémia | Referens   | p      |
|----------------------------|------------------------------|------------|--------|
| Vér kataláz MU/l           | 41,6±20,5                    | 113,3±16,5 | <0,001 |
| Vörösvértestszám T/l       | 4,52±0,30                    | 4,55±0,37  | NS     |
| Vér hemoglobin g/l         | 132±16,2                     | 145±12,5   | <0,001 |
| Vér glutationperoxidáz U/l | 141,9±16,2                   | 139,8±26,6 | NS     |
| Szérum kataláz kU/l        | 25,8±11,9                    | 50,5±18,1  | <0,001 |
| Szérum hemoglobin mg/l     | 38,7±15,9                    | 59,8±20,4  | <0,001 |
| Szérum haptoglobin g/l     | 1,09±0,42                    | 1,12±0,46  | NS     |
| Szérum LDH U/l             | 181±39                       | 180±30     | NS     |
| LDH1/LDH2                  | 0,43±0,08                    | 0,57±0,17  |        |

NS: nem szignifikáns p>0,05



## Hemolízis markerek akatalazémiában

| Hemolízis marker           | Akatalazémiások | Referens   |
|----------------------------|-----------------|------------|
| Vér kataláz MU/l           | 5,0 és 7,6      | 113,3±16,5 |
| Vörösvértestszám T/l       | 4,34 és 4,92    | 4,55±0,37  |
| Vér hemoglobin g/l         | 125 és 153      | 145±12,5   |
| Vér glutationperoxidáz U/l | 121 és 135      | 139,8±26,6 |
| Szérum kataláz kU/l        | 15,0 és 18,8    | 50,5±18,1  |
| Szérum hemoglobin mg/l     | 17,0 és 47,0    | 59,8±20,4  |
| Szérum haptoglobin g/l     | 1,61 és 1,37    | 1,12±0,46  |
| Szérum LDH U/l             | 200 és 249      | 180±30     |
| LDH1/LDH2                  | 0,40 és 0,43    | 0,57±0,17  |

A hemolízis vér és szérum paraméterei a hemoglobin (vér és szérum) kivételével nem mutattak szignifikáns eltérést a katalázhiányos egyéneknél.

### 5. 3. 3. 6. A katalázhiány és a homocisztein-, vörösvértest metabolizmus [15,33]

Irodalmi adatok mutatják, hogy a magas homocisztein koncentráció a jelentős mennyiségű hidrogénperoxid generálásával oxidatív stresszt okozhat, aminek hatása a katalázhiányos egyéneknél még fokozottabb. Ezért vizsgáltuk a katalázhiányos egyéneknél a homocisztein koncentrációt, illetve ennek növekedésének lehetséges hatásait.

A homocisztein, a vörösvértest metabolizmus és a hemolízis markerei veleszületett katalázhiányos családoknál, külön értékelve férfiaknál és nőknél

|                        | Férfiak                 |                          | p      |
|------------------------|-------------------------|--------------------------|--------|
|                        | Hypokatalazémiások (12) | Normokatalazémiások (17) |        |
| Kataláz MU/l           | 61,2±12,4               | 115,8±17,4               | <0,001 |
| B <sub>12</sub> pg/ml  | 336±108                 | 307±76                   | 0,401  |
| Fólsav ng/ml           | 5,44±2,81               | 7,56±1,97                | 0,036  |
| Homocisztein mol/      | 9,72±3,61               | 7,36±2,10                | 0,038  |
| Vér hemoglobin g/l     | 140,3±11,0              | 153,6±11,6               | 0,03   |
| MCV fl                 | 98,6±3,4                | 90,0±7,5                 | 0,001  |
| Szérum LDH U/l         | 319,5±36,8              | 310,5±39,5               | 0,552  |
| LDH 1/2                | 0,485±0,074             | 0,491±0,089              | 0,853  |
| Szérum haptoglobin g/l | 1,32±0,54               | 1,15±0,43                | 0,228  |
| Életkor év             | 49,2±21,9               | 47,0±11,6                | 0,643  |

| Nők                    |                         |                          |        |
|------------------------|-------------------------|--------------------------|--------|
|                        | Hypokatalazémiások (18) | Normokatalazémiások (12) | p      |
| Kataláz MU/l           | 52,0±12,4               | 100,7±8,8                | <0,001 |
| B <sub>12</sub> pg/ml  | 373±180                 | 342±75                   | 0,513  |
| Fólsav ng/ml           | 5,01±1,93               | 6,61±1,91                | 0,031  |
| Homocisztein mol/      | 9,06±3,10               | 6,84±2,50                | 0,049  |
| Vér hemoglobin g/l     | 128,4±10,7              | 139,6±9,2                | 0,010  |
| MCV fl                 | 95,9±3,9                | 90,1±2,5                 | 0,001  |
| Szérum LDH U/l         | 295,2±65,8              | 288,0±48,3               | 0,751  |
| LDH 1/2                | 0,558±0,156             | 0,513±0,127              | 0,426  |
| Szérum haptoglobin g/l | 1,30±0,42               | 1,22±0,18                | 0,543  |
| Életkor év             | 42,9±12,5               | 47,6±13,2                | 0,338  |

Szignifikáns eltérést kaptunk a fólsav, homocisztein, vér hemoglobin és MCV (vörösvértest Mean Cell Volume) értékeknél mindkét nem esetén.

A férfiak illetve a nők esetén hasonlóak voltak az eltérések, de az abszolútértékek (hypo és normokatalazémiások) kismértékben különböztek. Ez is indokolta, hogy a nemek szerinti megoszlásban történjen a vizsgálati eredmények értékelése.

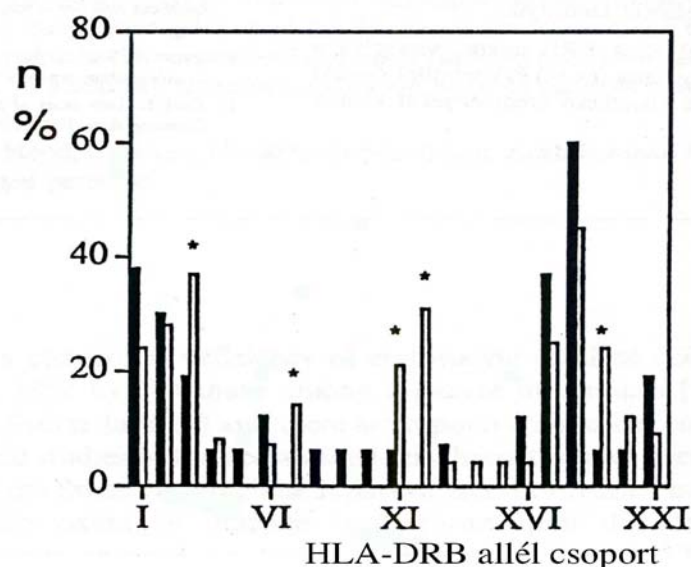
### 5. 3. 3. 7. A katalázhiány és a HLA-DRB allél típusok [16,34]

A Human Major Histocompatibility Complex (MHC) molekuláinak feladata az antigén felismerés. A Human Leukocyte Antigen (HLA) gének a 6-os kromoszóma rövid karján találhatóak. A HLA-DRB régió tartalmazza a DRA és DRB struktúr génjeit.

A HLA-DRB allélok ismerete fontos a transzplantációknál és a fogékonysági allélok (autoimmun, bizonyos tumorok, diabetes) patomechanizmusának felderítésében.

Az 1997-ben újak számítógépes AMPLICOR kit teszttel vizsgáltuk a HLA-DRB allélok megoszlását 16 hypokatalazémiás (vér kataláz 51,5±17,8 MU/l) és 24 normokatalazémiás (108,6±13,6 MU/l) egyénnél.

A vizsgálatokkal arra a kérdésre kerestük a választ, hogy a veleszületett katalázhiányos egyének rendelkeznek-e további fogékonysági allélokkal.



A HLA-DRB allélok gyakorisága kontrolloknál (fekete oszlop) és hypokatalazémiásoknál (fehér oszlop)

A \*-al jelölt alléloknál a két csoport közötti különbségek elemzését a következő táblázat mutatja.

| Allél csoport | Allél gyakoriság |          | p    | Lehetséges DRB allélok                              |
|---------------|------------------|----------|------|---|
|               | Hypokatalazémia  | Kontroll |      |   |
| III           | 18,7%            | 37,5%    | >0,8 | DRB1: 1101, 1103, 1104, 1106, 1108-113              |
| VII           | 0%               | 12,5%    | >0,2 | DRB1: 1301, 1302, 1308                              |
| XI            | 6,2%             | 20,8%    | >0,3 | DRB1: 0301, 0403, 0404, 0406-0408, 0413, 0416, 0419 |
| XII           | 0%               | 29,2%    | >0,3 | DRB1: 0701  |
| XIX           | 6,2%             | 37,5%    | >0,5 | DRB4: 0101-0103                                     |

A kisszámú mintát tartalmazó vizsgálat statisztikai analízise nem mutatott szignifikáns ( $p > 0,2$ ) eltérést az allél megoszlásban a hypokatalazémiások és a kontrollok között.

A vizsgálatok egy esetben, a DRB0701 allélnál utalnak egy konkrét allélra, míg a többi esetben az allélek egy csoportját adják meg.

### 5. 3. 4. Az öröklődő katalázhiány genetikai jellemzői

#### 5. 3. 4. 1. A molekuláris genetikai vizsgálati stratégia [17-21,38,40,39,41]

A veleszületett katalázhiány magyarországi detektálása, klinikai és klinikai kémiai jellemzése után megkezdtem a katalázhiányért felelős mutáció(k) keresését.

Ehhez a munkához felhasználtam a Stanfordi Egyetem Patológiai Intézetében (Laboratory of Experimental Oncology, Department of Pathology, School of Medicine, Stanford University, Stanford, CA, USA) Fulbright kutatói ösztöndíjasként elsajátított, az 1992-ben újnak minősülő molekuláris genetikai vizsgálatokat, amelyeket itthon bevezettem.

Ezek a következők: genomiális DNS extrahálás anioncserés eljárással, nem radioaktív DNS detektálás [17], az akatalazémia vizsgálatához szükséges kataláz próba készítése [18], és a polimeráz láncreakció termékeinek új módszerekkel (repeat-, RFLP-, SSCP-, heteroduplex analízis) történő mutáció szűrési/kimutatási módszerei [19].

A magyarországi katalázhiányos családok akatalazémiás, hypokatalazémiás és normokatalazémiás családtagjaitól a vér fehérvérsejtjeiből anioncserés eljárással DNS-t extraháltunk.

A gDNS-ből PCR reakcióval az egyes exonokat amplifikáltuk (5':165 bp, 3': 676 bp, 13 exon, exon-intron régiók: 5-50 bp) és ezeket SSCP- heteroduplex mutáció szűrési analízissel vizsgáltuk a lehetséges polimorfizmusok felderítésére.

Ha a mutáció szűrési eljárás(ok) polimorfizmust mutattak, akkor a mutáció kiderítésére nukleotid szekvencia analízis készült.

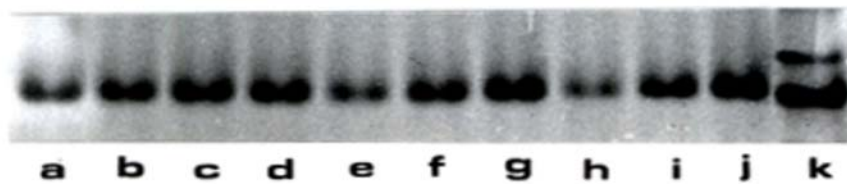
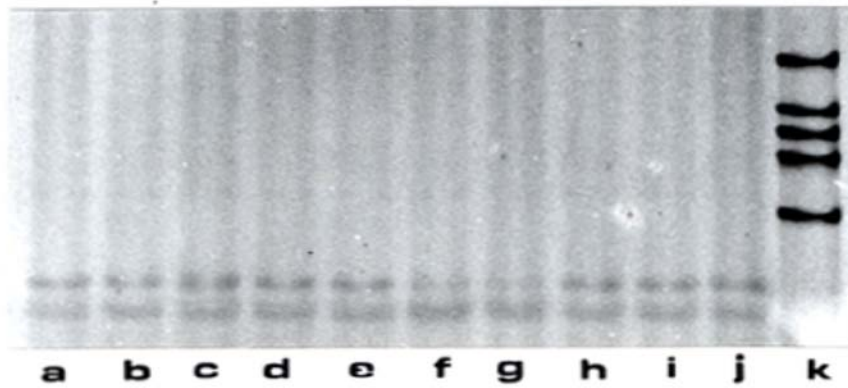
Ha a nukleotid szekvencia analízis mutációt mutatott, akkor vizsgáltuk, hogy ez a mutáció megtalálható-e az összes katalázhiányos családtagnál és nem mutatható ki a normokatalazémiás családtagoknál.

Ezek ismeretében és irodalmi adatok alapján a mutáció által okozott aminosav változás hatását vizsgáltuk a kataláz fehérje szerkezetére, illetve az enzim aktivitására.

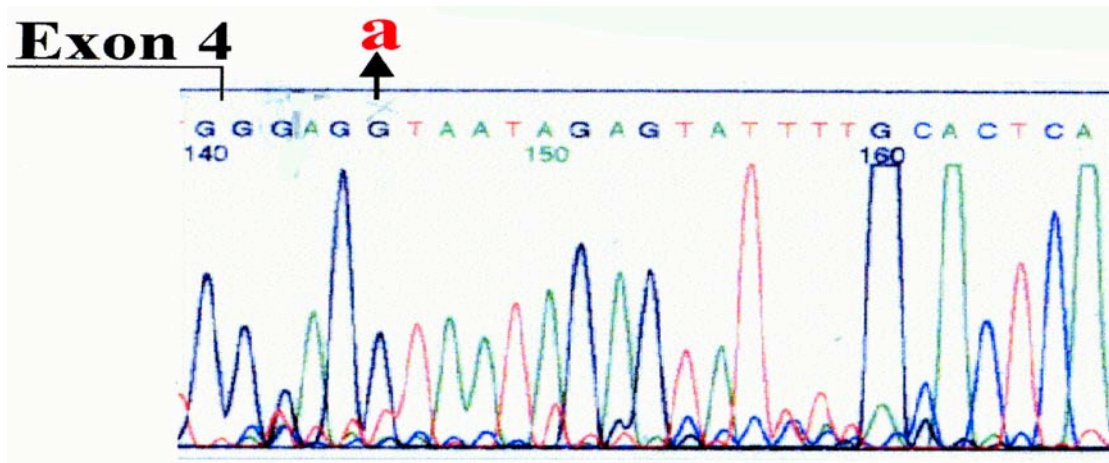
A mutációt akkor fogadtuk el a katalázhiányért felelős mutációnak, ha az előbbi feltételek mind teljesültek, és a genotípus-fenotípus kapcsolat plauzibilis magyarázatát tudtuk adni [20, 21].

#### **5. 3. 4. 2. A Japán és a Magyar akatalazémia molekuláris genetikai összehasonlítása [22, 23,42,43]**

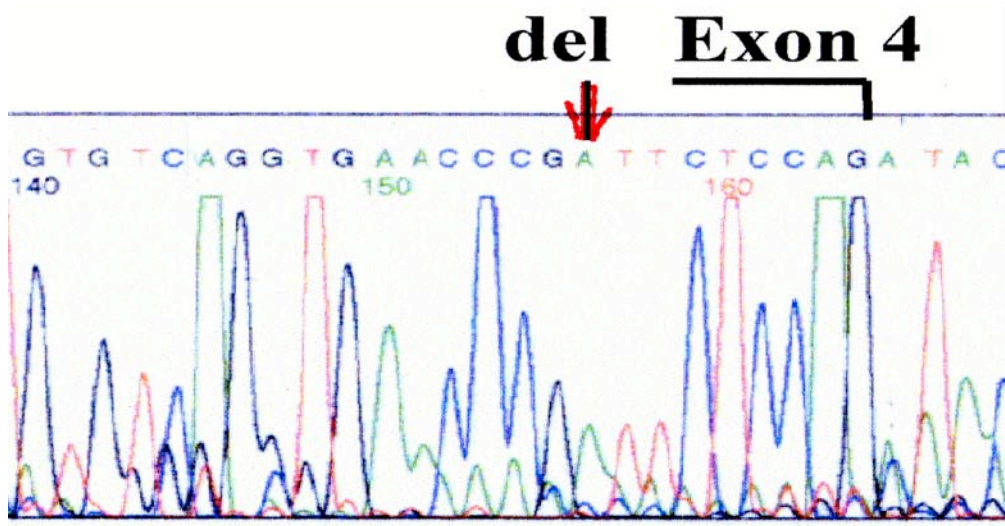
A mutáció szűrési stratégiát először az ismert Japán A és B típus mutációinak kimutatására alkalmaztam a magyarországi katalázhiányos egyéneknél.



A kataláz gén 4. exonjának PCR-SSCP (fent) és PCR-heteroduplex (lent) analízise a Japán A és B típusú akatalazémia mutációjának kimutatására Magyarországi akatalazémiában. Normokatalazémiás kontroll: a, b, f, h, I, g, akatalazémiások: c, d, hypokatalazémiás: e, k: molekulatömeg marker (fent), heteroduplex kontroll (lent).



A Japán A típusú akatalazémiára jellemző G → A szubsztitúció (4. intron 5. pozíció) nem található meg a Magyarországi akatalazémiás egyénnél



A Japán B típusú akatalazémiára jellemző T deléció (4. exon 10. pozíció) nem található meg a Magyarországi akatalazémiás egyénnél.  
 Reverez primerrel készült szekvencia analízis

A PCR-SSCP, PCR-RFLP, PCR-heteroduplex és a nukleotid szekvencia analízis azt mutatta, hogy sem a Japán A típus mutációja (G5A splicing mutáció a 4. intronban) sem a Japán B típus mutációja (Tdel10, a 4. exonban) nem mutathatók ki a Magyarországi akatalazémiás családokban.

### 5. 3. 4. 3. Benignus kataláz polimorfizmusok Magyarországon [24-26,44-46]

A veleszületett katalázhiányért felelős mutációk vizsgálata során a következő polimorfizmusokat találtuk, amelyek nem járnak kataláz aktivitás csökkenéssel.

A kataláz gén 5' végének analízise HinfI RFLP módszerrel a régió nagyfokú polimorfizmusát mutatta. A 9 különböző DNS fragmentből 8 mintázat alakult ki, de ezek közül egyik sem volt jellemző a hypo- vagy akatalazémiára [24], mint ezt az alábbi adatok mutatják.

| Fragment | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
|----------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 2,1 kb   | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 1,5 kb   | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 1,2 kb   | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 1,1 kb   | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 0,9 kb   | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 0,8 kb   | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 0,6 kb   | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 0,5 kb   | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 0,4 kb   | — | — | — | — | — | — | — | — | — |

Normokatalazémiások: 1, 2, 4-9, akatalazémiás: 3.

A vizsgálatok során a következő kataláz polimorfizmusokat detektáltuk. A kövér betűvel jelzett polimorfizmusokról először mi számoltunk be.

5' régió: A-21T, C-20A, C-18T, T4C, T44C, T49C, exon 1: C12T, C27A,  
intron 1: G60A, G61T, intron 2: G7A, T11A, intron 12: G31T.

A polimorfizmusok benignus jellegét szemlélteti a következő táblázat, amely az egyes allélok gyakoriságát mutatja akatalazémiában, hypokatalazémiában és normokatalazémiában.

A kataláz gén vizsgált régiója a következő gén szakaszokat tartalmazta: 5': 165 bp, 1. exon: 63 bp, 1. intron: 20 bp.

| Pozíció          | 5' régió |      |       |      |      |       | 1. exon |       |
|------------------|----------|------|-------|------|------|-------|---------|-------|
|                  | -21      | -20  | -18   | 4    | 44   | 49    | 12      | 27    |
| Mutáns/vad       | T/A      | A/C  | T/C   | C/T  | C/T  | C/T   | T/C     | A/C   |
| Akatalazémia     | 4/0      | 0/4  | 2/2   | 0/4  | 3/1  | 3/1   | 0/4     | 2/2   |
| Hypokatalazémia  | 36/2     | 3/35 | 18/20 | 3/35 | 3/35 | 15/23 | 3/35    | 13/25 |
| Normokatalazémia | 11/9     | 1/19 | 8/12  | 1/19 | 5/15 | 6/14  | 2/18    | 3/17  |

A táblázat adatai azt mutatják, hogy az egyes allélok változó gyakorisággal fordulnak elő mindhárom csoportban.

Három olyan mutáció van (-21, -20, 4 nukleotid pozíció), amelyben az akatalazémiás mutáció 100%-os (-21) vagy 0%-os (-20, 4) gyakoriságú, amelyek közül az első érdemel részletesebb magyarázatot.

A -21-es pozícióban az akatalazémiásoknál csak a mutáns T található, a hypokatalazémiásoknál ennek gyakorisága mintegy 95%, azonban a normokatalazémiásoknál is több, mint 50%. Ezek alapján arra következtethetünk, hogy ebben a nukleotid pozícióban Magyarországon a vad típusnál van T és a mutánsnál az A nukleotid.

Az ismert kataláz enzim mutációkat egy Review-ban foglaltam össze [27].

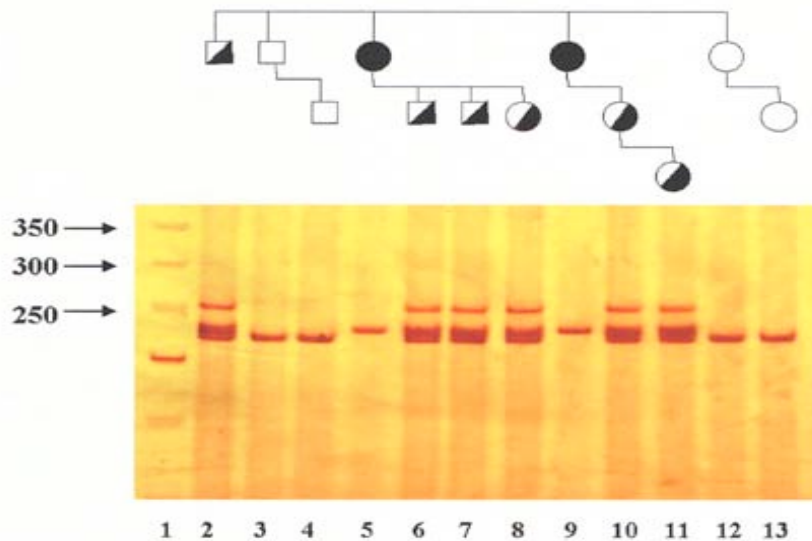
#### 5. 3. 4. 4. A Magyarországi akatalazémia genetikai típusai

A Magyarországon detektált akatalazémia genetikailag különböző mutációk eredménye, mint a más országokban detektált mutációk következményeként kialakult katalázhiány.

Vizsgálataink tovább erősítették az akatalazémia genetikai heterogenitását, és a különböző mutációkat az abc nagy kezdő betűivel jelöltem.

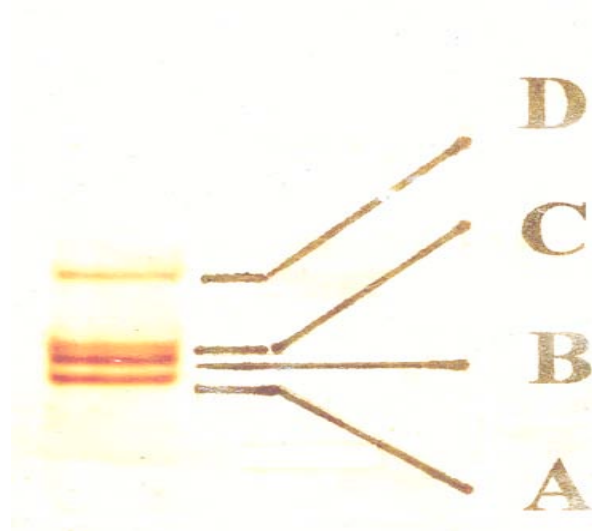
### 5. 3. 4. 4. 1. A Magyarországi akatalazémia A típusa [27,28,47,48]

A mutáció szűrési eljárások közül a heteroduplex analízis az akatalazémiás család tagjai 2. exonjának vizsgálatakor különösen szépen detektálható heteroduplex képződést mutatott [28]. A heteroduplex képződés a család összes hypokatalazémiás tagjánál megfigyelhető volt, míg a normokatalazémiások közül egyiknél sem.



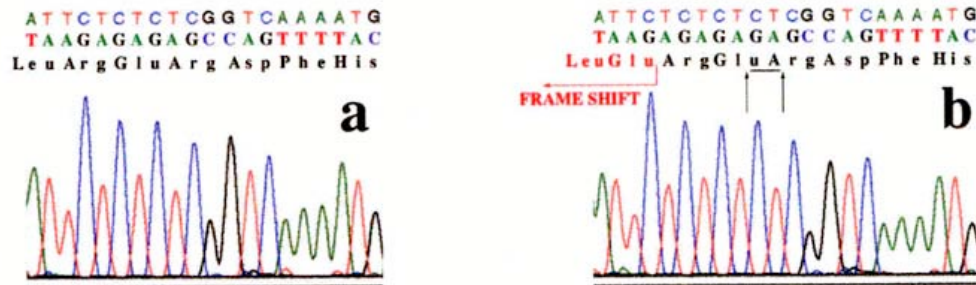
Az akatalazémiás család pedigréje (fent) és a PCR-heteroduplex mutáció szűrési eljárás (lent)

A következő, nagyított ábrán szépen láthatók az egyes DNS sávok. Az ilyen szépen demonstrált heteroduplex képződés irodalmi ritkaság.





PCR-heteroduplex analízis heterozigóta egyénnél. A vad-vad homoduplex (A, 268 bp), a mutáns-mutáns homoduplex (B, 270 bp), a vad(s)-mutáns heteroduplex 1 (C, 273 bp), és a vad(as)-mutáns heteroduplex 2 (D, 305 bp)

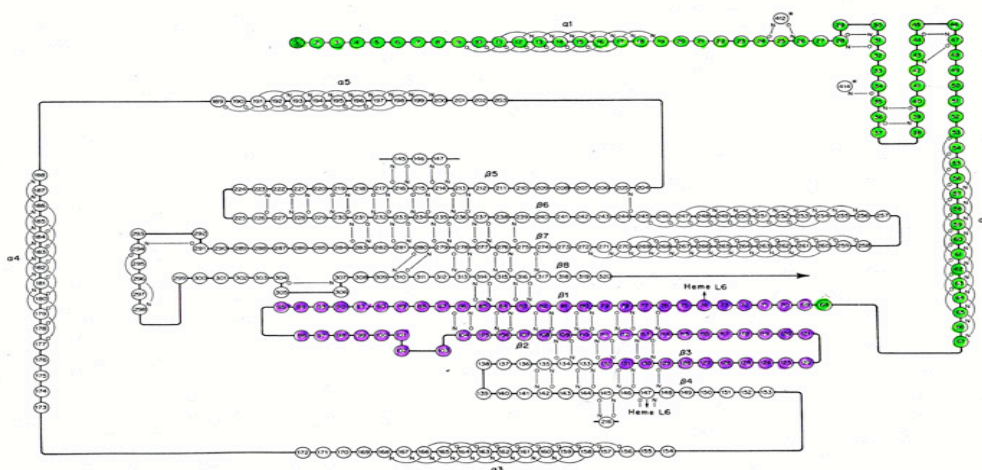


Kataláz gén 2. exonjának nukleotid szekvencia analízise reverz primerrel  
a: normokatalazémiás (4 GA ismétlődés), b: akatalazémiás (4+1=5 GA ismétlődés).

A nukleotid szekvencia analízis azt mutatta, hogy a 2. exon 138-as nukleotid helyén egy GA beépülés detektálható, amely a GA ismétlődések számát 4-ről 5-re növelte meg.

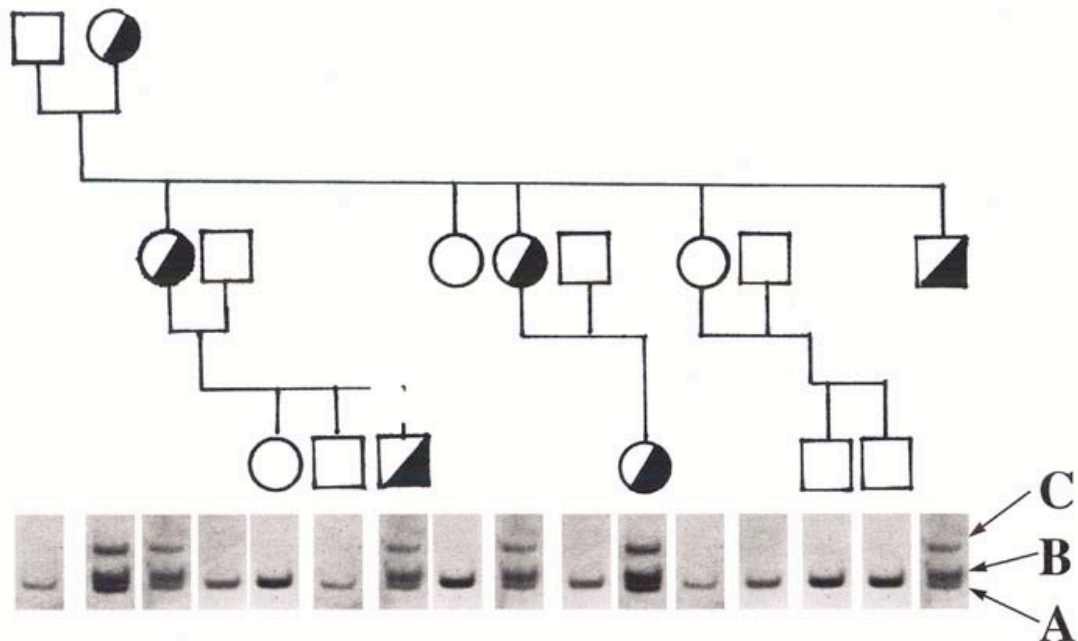
Ez a GA beépülés egy frameshift-et (vázeltolódás) eredményezett, ami megváltoztatta az aminosav sorrendet a 69. aminosavtól a 133. aminosavig.

Az inszerció azt is eredményezte, hogy a 399-401 nukleotid helyeken generálódott egy TGA stop kodon, amelynek eredménye a 133 aminosavból álló trunkált protein. Ez a trunkált protein nem tudja ellátni az 527 aminosavból álló kataláz alegység enzimatikus funkcióját.



A kataláz alegység aminosav sorrendje. A világossal jelölt aminosavak helyesen kódoltak (1-68), a sötéttel jelzett aminosavak megváltoztak (69-133), és a 133. az utolsó aminosav a trunkált alegységben.

A PCR-heteroduplex mutáció szűrés a kataláz gén 2. exonjában a GA beépülés révén olyan hatékony, hogy ennek az egyszerű módszernek az alkalmazásával további 3 hypokatalazémiás családban sikerült azonosítani a szindrómát okozó mutációt [29].



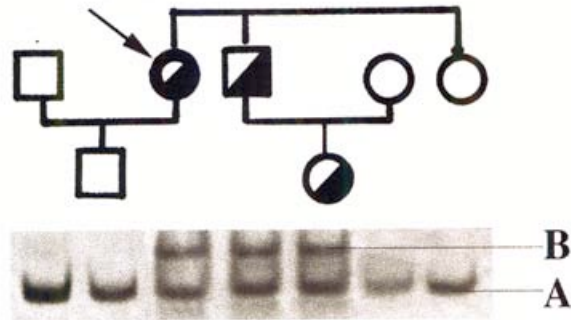
Magyarországi hypokatalazémiás család pedigréje és a mutációt felderítő PCR-heteroduplex analízis. A: homozigóta duplexek, B és C heteroduplexek.

Ez a mutáció kimutatható volt az akatalazémiás család két akatalazémiás tagjánál (4,5 MU/l és 7,6 MU/l) és ezen család 6 hypokatalazémiás, valamint további három hypokatalazémiás 23 tagjánál ( $49,2 \pm 19,5$  MU/l, 45,8%). Ezen családok 26 normokatalazémiás tagjánál ( $107,6 \pm 19,5$  MU/l, 100%) ez a mutáció nem volt megtalálható.

#### 5. 3. 4. 4. 2. A Magyarországi akatalazémia B típusa [29,49]

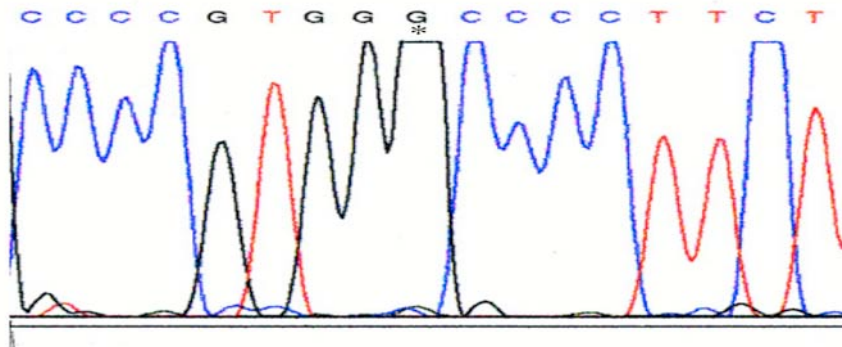
A 2. exon vizsgálatakor a PCR-heteroduplex analízis polimorfizmust mutatott az egyik hypokatalazémiás családnál.

Ez a mutáció 1 hypokatalazémiás család 3 hypokatalazémiás tagjánál ( $68,1 \pm 5,9$  MU/l, 52,2%) volt kimutatható. A 4 normokatalazémiás családtagnál ( $130,4 \pm 8,7$  /MU/l, 100%) a mutáció nem volt megtalálható.

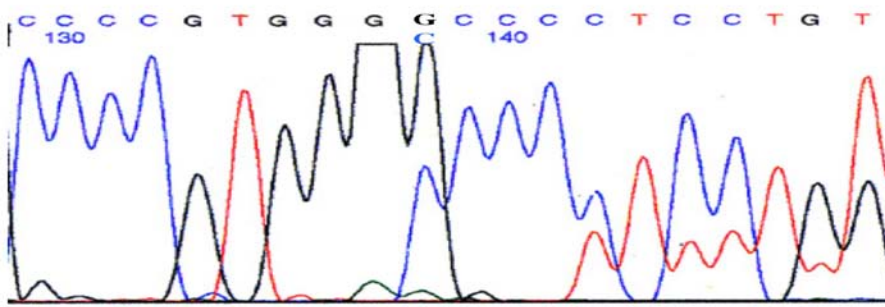


Hypokatalazémiás család pedigréje (fent) és a PCR-heteroduplex analízis (lent),  
A: homoduplex, B: heteroduplex, a nyíl a probandot mutatja

A nukleotid analízis kiderítette, hogy a 2. exon 79-es nukleotid pozíciójába egy G nukleotid ékelődik be.

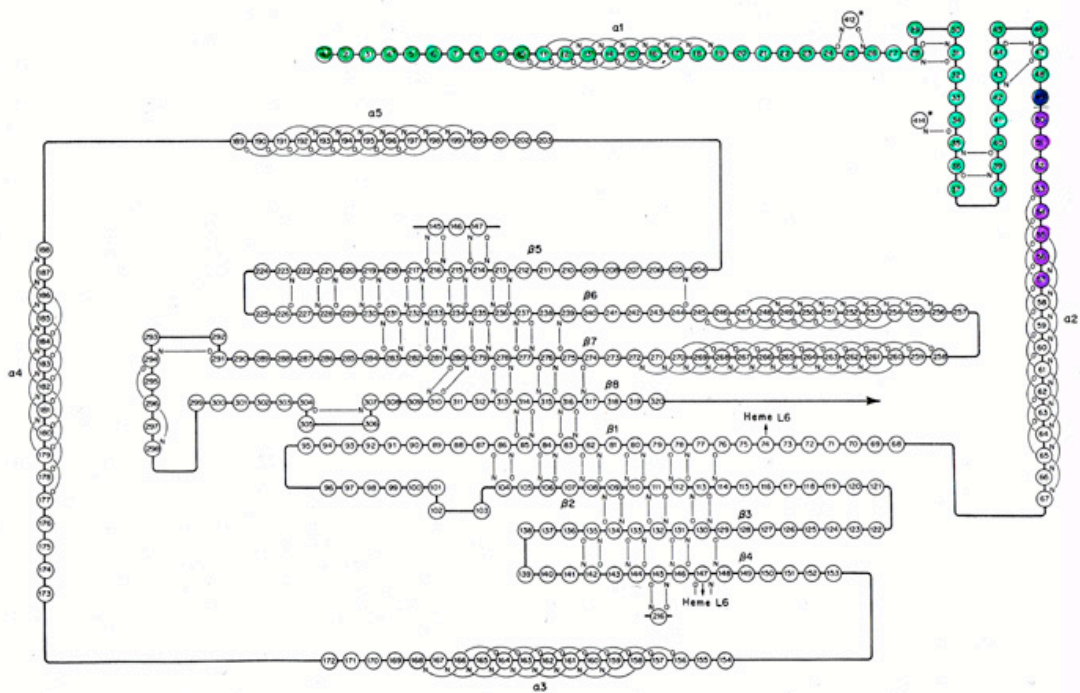


Normokatalazémiás családtag kataláz gén 2. exonjának nukleotid szekvenciája.  
A \*-al jelölt G nukleotidnál lesz a beépülés



Hypokatalazémiás családtag kataláz gén 2. exonjának nukleotid szekvenciája.  
A G nukleotidnál következett be a mutáció, a C nukleotid beékelődése révén a  
szekvencia ettől a ponttól nehezen olvasható

Ez a mutáció vázeltolódást eredményez a 49. aminosavtól az 57. aminosavig.  
A mutáció további eredménye, hogy a 171-173 nukleotid pozíciókban egy TGA  
terminációs kodon generálódik és ennek eredményeként az 527 aminosavból álló  
kataláz alegység helyett egy 57 aminosavból álló trunkált protein képződik.



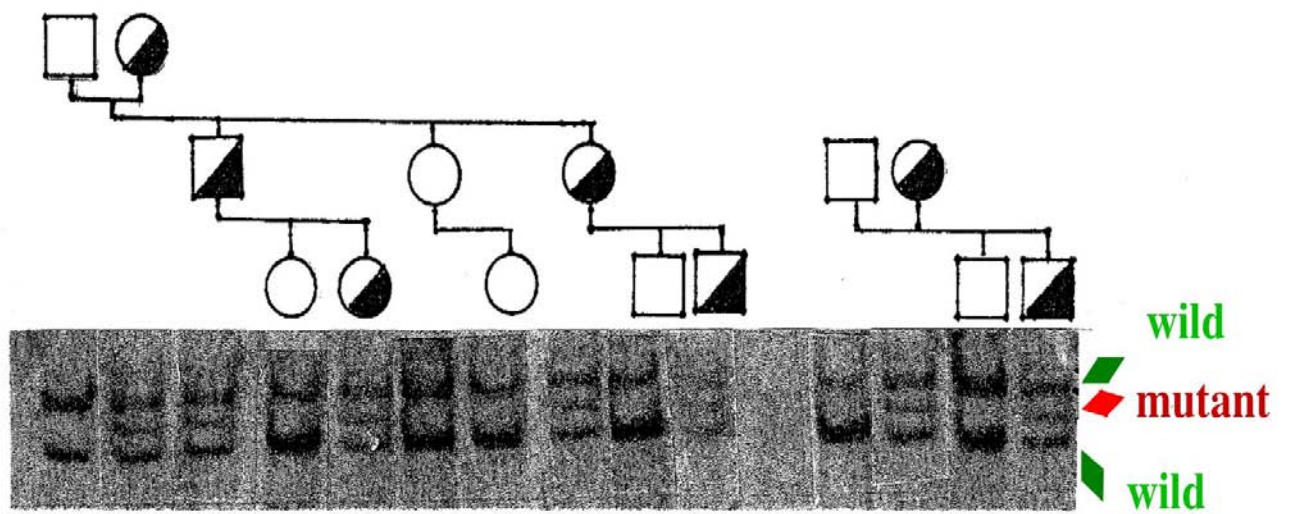
A kataláz alegység aminosav sorrendje.

A világossal jelölt 1-48 aminosav változatlan, a sötéttel jelölt 49-től 56-ig a frameshift miatt megváltozott és 57. aminosavnál be is fejeződött az átírás

### 5. 3. 4. 4. 3. A Magyarországi akatalazémia C típusa [30,50]

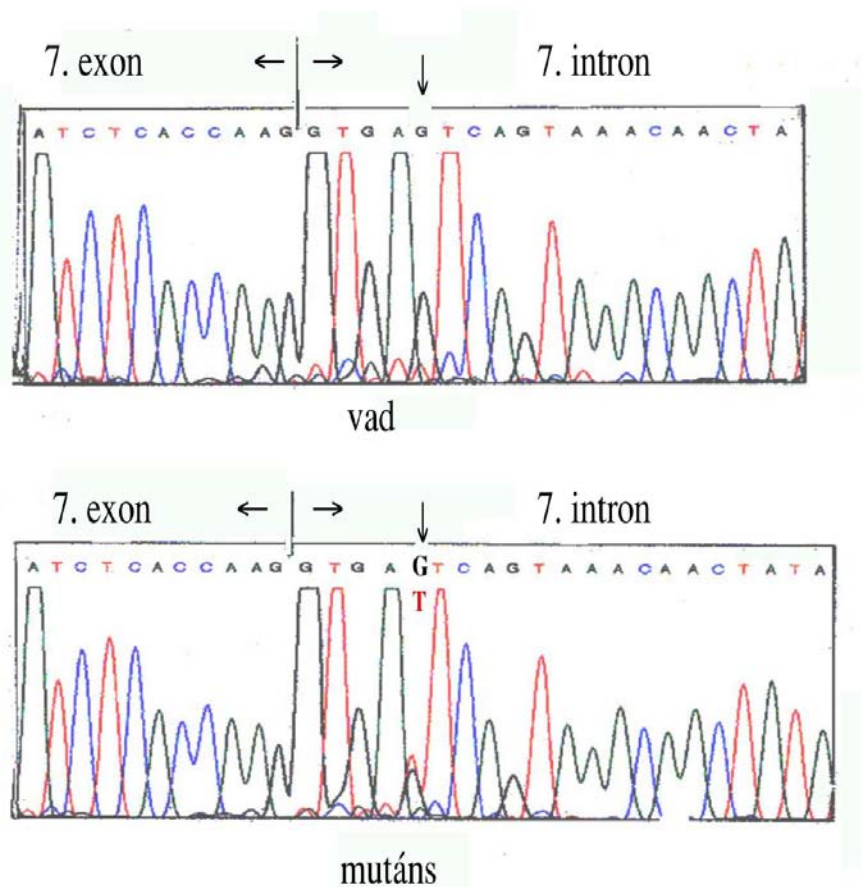
A PCR-SSCP mutáció szűrési eljárás polimorfizmust mutatott két család hypokatalazémiás tagjainál.





Magyarországi C típusú két hypokatalazémiás család: családfa (fent), PCR-SSCP analízis (középen), kataláz fehérje Western blot analízise (alul)

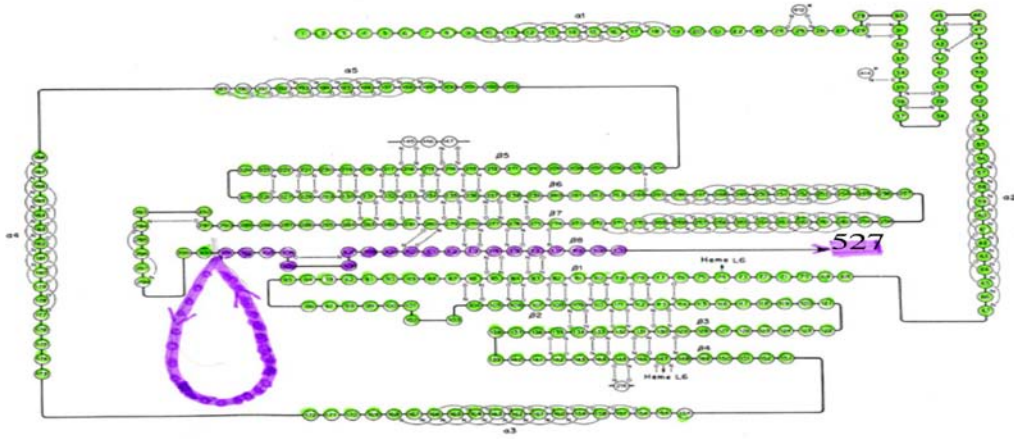
A nukleotid szekvencia analízis azt mutatta, hogy a 7. intron 5. pozíciójában a G (vad) nukleotid mellett T (mutáns) nukleotid is található.



Normo-(fent) és hypokatalazémiás (lent) egyének nukleotid szekvenciája.  
 A 7. intron 5. pozíciójában a hypokatalazémiásnál G (vad) és T (mutáns) nukleotidok találhatóak

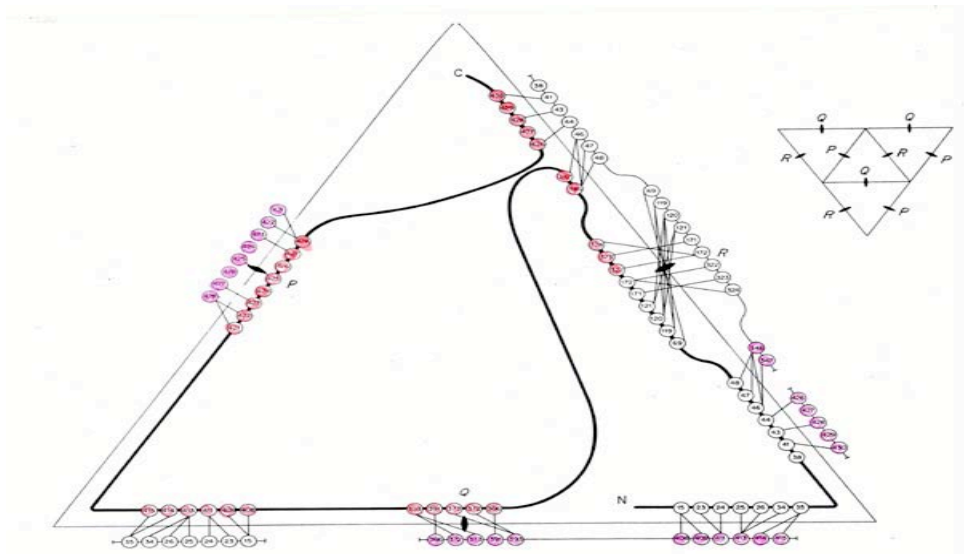
Az exon-intron határ közelében lévő mutációról feltételezhető, hogy splicing (kivágási) típusú mutáció. Ezt Western blot analízissel igazoltuk, amelyik a hypokatalazémiásoknál detektált enzim aktivitás csökkenésén túlmenően a kataláz fehérje csökkenését is igazolta.

Ennek a mutációnak a hatását az aminosav szekvenciában mutatja a következő ábra, amelyen a 1-299 aminosavak változatlanok, míg a 300.-tól frameshift révén trunkált aminosavak képződnek.

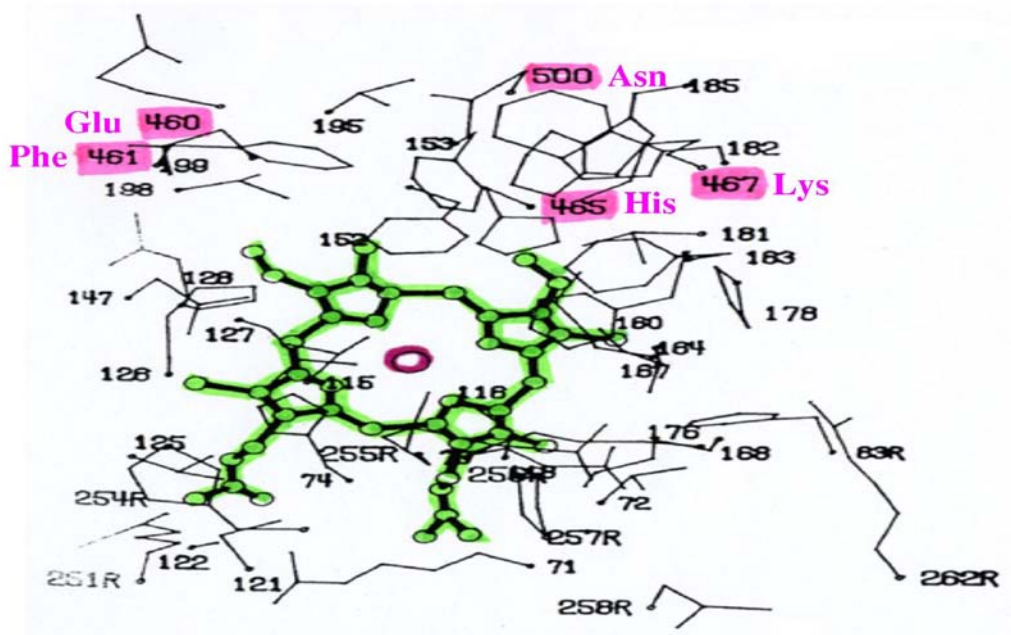


A C típusú kataláz gén mutáció hatása az alegység aminosav szekvenciájára. A változatlan aminosavak világossal jelölve, a mutáció révén változottak sötéttel.

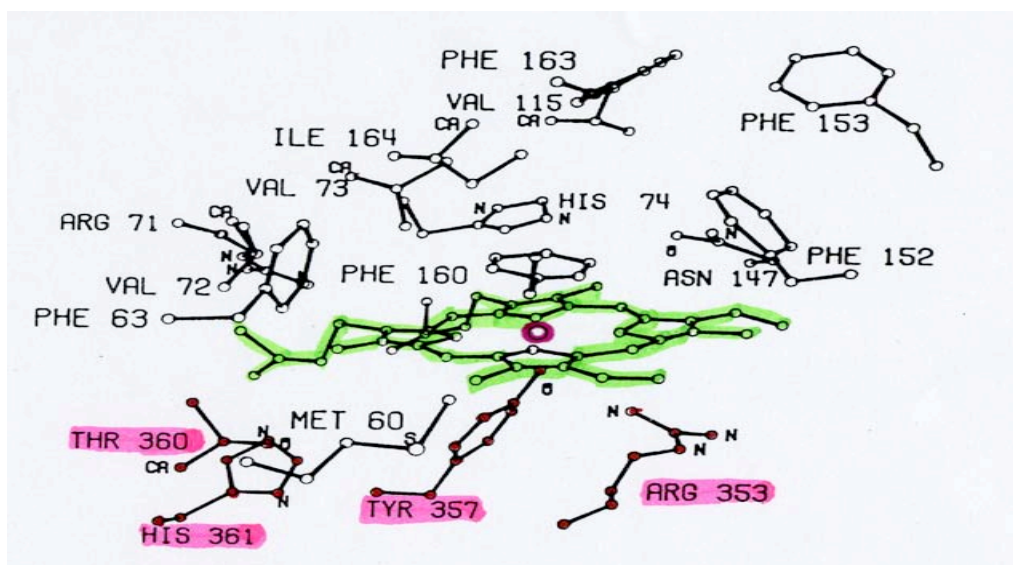
Az aminosav változás érinti az alegységek közötti kötődést, a hem környezetében található essenciális (Tyr360, His361, Tyr357, Arg353), és a fő (hidrofób) csatorna kialakításában résztvevő fontos (Glu460, Phe461, His465, Lys467, Asn500) aminosavakat.



A mutáció lehetséges hatása az alegységek közötti kapcsolódásokra. Sötéttel jelölve a mutáció révén megváltozott aminosavakat



Az fő csatorna közelében lévő fontos aminosavak, amelyek a mutáció révén változhattak, ezeket kiemeléssel jeleztem, középen a hem is kiemelve.



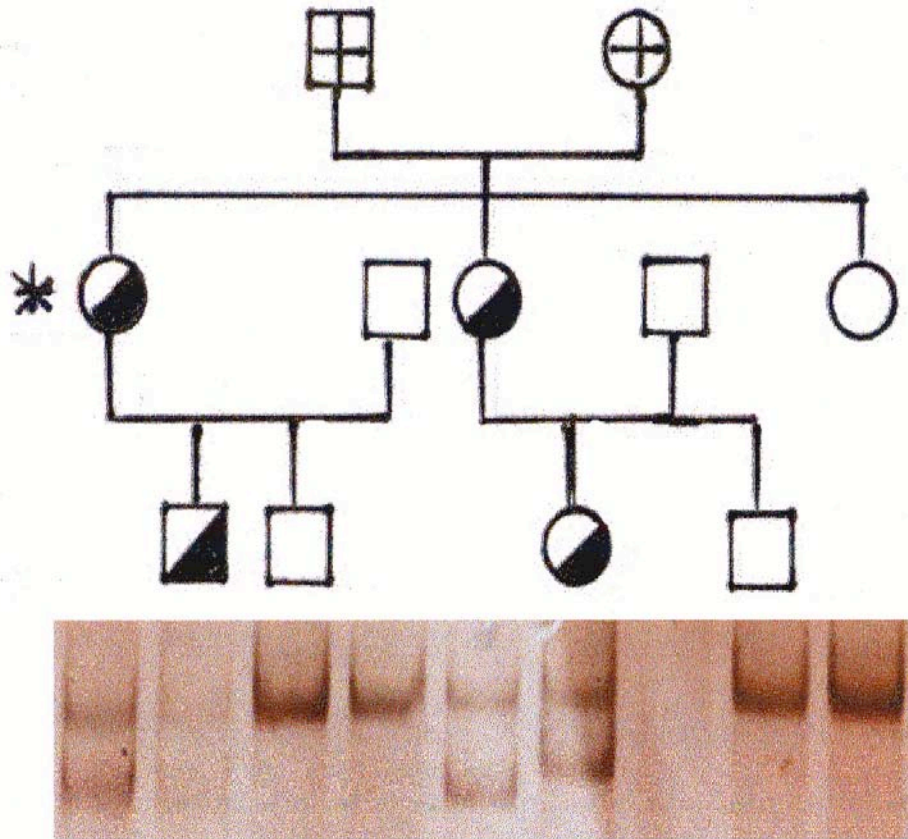
Az aktív centrum közelében lévő fontos aminosavak közül kiemelve azok, amelyek a mutáció révén változhattak

Ezt a mutációt 2 hypokatalazémiás család 7 hypokatalazémiás ( $58,5 \pm 11,5$  MU/l, 60,6%) tagjánál mutattuk ki. A két család normokatalazémiás tagjainál nem változott a kataláz aktivitás ( $96,9 \pm 4,1$  MU/l, 100%).



#### 5. 3. 4. 4. 4. A Magyarországi akatalazémia D típusa [31,51]

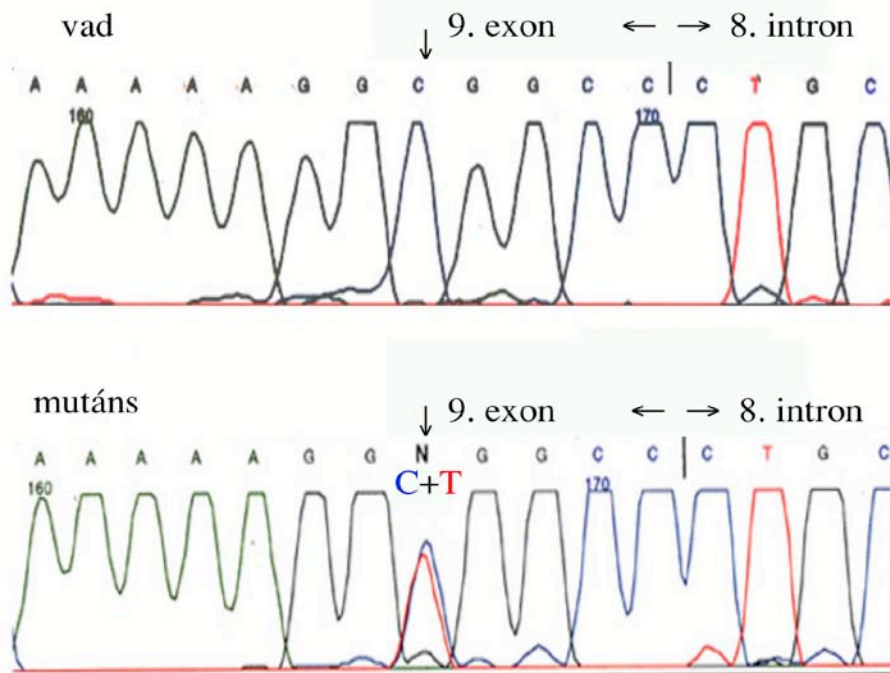
A PCR-SSCP mutáció szűrési eljárás a 9. exon vizsgálatakor polimorfizmust mutatott egy hypokatalazémiás család 4 hypokatalazémiás tagjánál.



A magyarországi hypokatalazémiás család pedigréje (fent) és a 9. exon PCR-SSCP analízise (lent).

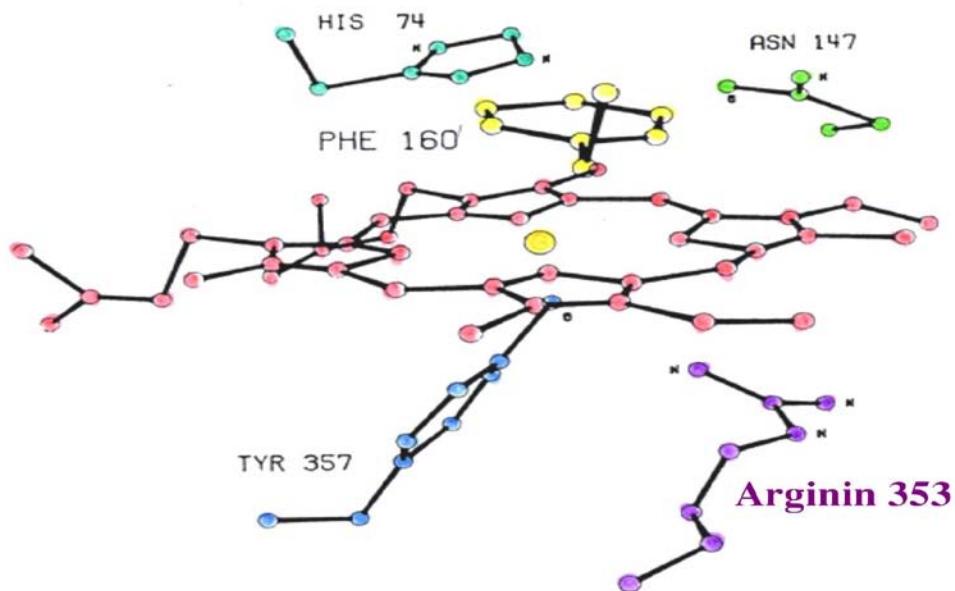
A vad típusnál csak 1 DNS sáv, míg a heterozigóta mutánsnál (hypokatalazémia) két DNS sáv látható

A nukleotid szekvencia analízis a 9. exon 5. helyén G (vad) és T (mutáns) nukleotidokat azonosított.



A D típusú mutációnál a 9. exon 5. pozíciójában a C (vad) mellett T (mutáns) nukleotid is látható

Ez a missense mutáció a 353(354) Arginint Ciszteinné változtatta



A mutáns arginin (kiemelve) pozíciója a hem a hem esszenciális aminosavjai között

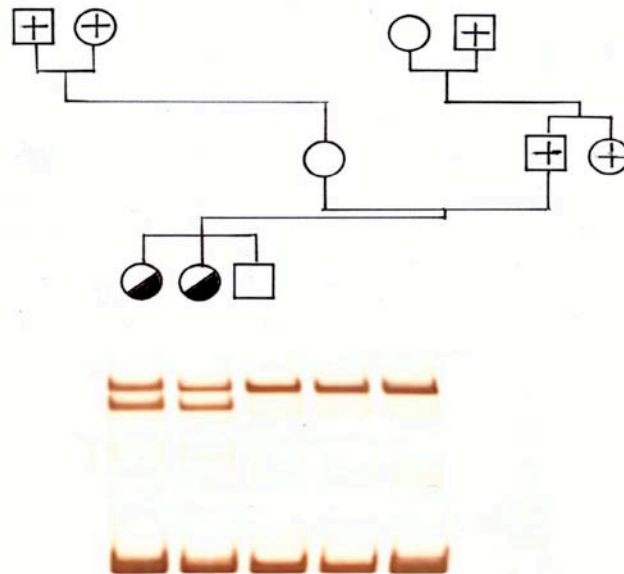
Ezt a mutációt egy hypokatalazémiás család 4 hypokatalazémiás tagjánál ( $55,6 \pm 16,9$  MU/l, 53,7%) detektáltuk, míg a 6 normokatalazémiás ( $103,6 \pm 23,5$  MU/l, 100%) nem volt kimutatható.

#### 5. 3. 4. 4. 5. A Magyarországi akatalazémia E típusa

A Debreceni Egyetem Orvos- Egészségtudományi Centrum, Bőrgyógyászati Klinikájával történő kollaboráció keretében a Kelet-Magyarországi Régió vitiligos betegeinek vizsgálatai közé a vér kataláz aktivitás mérését is beiktattuk, mivel erre vonatkozóan kevés és ellentmondásos adat található az irodalomban.

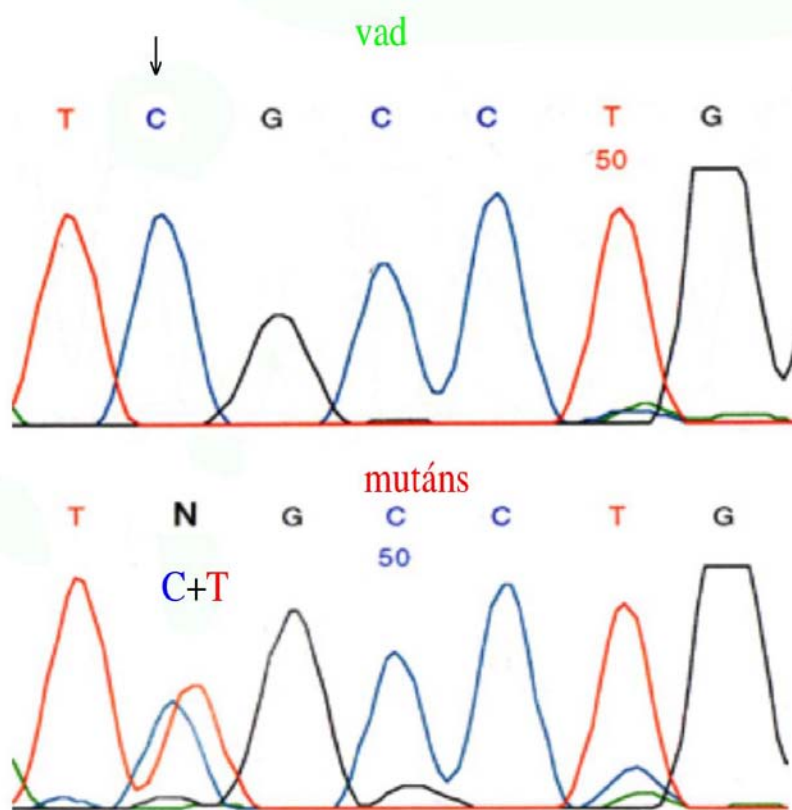
A vér kataláz referens átlagának felénél kisebb kataláz aktivitások esetén a vitiligos egyéneknél gDNS extrakció történt. Ezeket a mintákat felhasználva vizsgáltuk, hogy a csökkent kataláz aktivitást magyarázhatja-e a kataláz gén ismert mutációja.

A 9. exon (Magyarországi D típus) vizsgálatkor a PCR-heteroduplex és PCR-SSCP mutáció szűrési eljárások a D típustól eltérő polimorfizmust mutattak egy vitiligos betegnél. Ezután a vizsgálatba bevontuk a kisszámú, élő családtagokat.

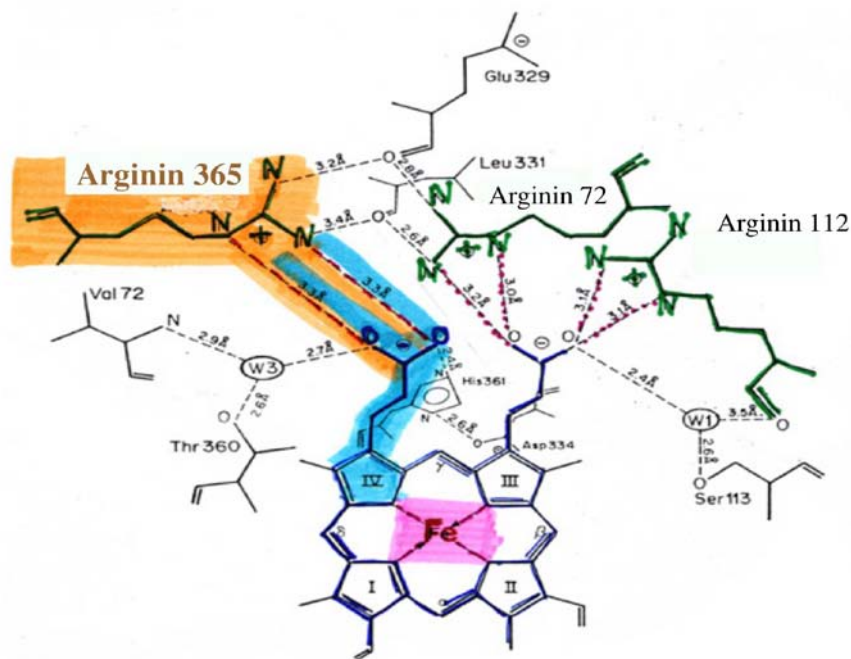


E típusú hypokatalazémiás család pedigréje (fent) és PCR-SSCP analízise: heteroduplexek (középen alsó sor) és homoduplexek (legalsó sor)

A nukleotid szekvencia analízis a 9. exon 37. pozíciójában C (vad) és T (mutáns) nukleotidokat mutatott. Ez a nukleotid csere a következő aminosav cserét indukálta: az Arginin 365(364) változott Ciszteinné.



Magyarországi E típusú katalázhiányban a nukleotid szekvencia: vad típus (fent), a nyíllal jelzett pozícióban C, mutáns (lent) ahol a C (vad) mellett a T (mutáns) is detektálható



Az Arg 365 szerepe: kötődése a hem propionjához

Ezt a mutációt egy hypokatalazémiás család 2 hypokatalazémiás tagjánál ( $66,9 \pm 7,1$  MU/l, 61,6%) detektáltuk. A kisszámú élő tagú család két normokatalazémiás ( $108,5 \pm 2,6$  MU/l) tagjánál a mutáció nem volt kimutatható.

### Irodalom

1. Góth L. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clinica Chimica Acta* 1991; 196: 143-152. [22]
2. Vitai M, Góth L. Reference ranges of normal blood catalase activity and levels in familial hypocatalasemia in Hungary. *Clinica Chimica Acta* 1997; 261: 35-42. [25]
3. Góth L. Öröklődő kataláz-enzimhiányos állapotok Magyarországon. *Orvosi Hetilap* 2000; 141: 445-447. [30]
4. Góth L. Two cases of acatalasemia in Hungary. *Clinica Chimica Acta* 1992; 207: 155-158. [29]
5. Góth L, Eaton JW. Hereditary catalase deficiencies and increased risk of diabetes. *Lancet* 2000; 356: 1820-1821. [32]
6. Góth L. A new type of inherited catalase deficiencies: Its characterization and comparison to the Japanese and Swiss type of acatalasemia. *Blood Cells Molecular Diseases* 2001; 27: 512-517. [31]
7. Góth L, Rass P, Pay A. Catalase enzyme mutations and their association with diseases. *Molecular Diagnosis* 2004; 8:141-149. [46]
8. Góth L. A kataláz enzim klinikai vonatkozásai és mutációi Magyarországon. *Lege Artis Medicinæ* 2005; 15: 274-278. [4]
9. Góth L. Hypocatalasemia in hospital patients. *Clinical Chemistry* 1996; 42: 341-342. [26]
10. Góth L, Lenkey A, Bigler NW. Blood catalase deficiency and diabetes in Hungary. *Diabetes Care* 2001; 24: 445-447. [28]
11. Jermedy G. Hungarian register new and improved. *Brit Med J* 1994; 308: 134-135.

12. Góth L. Lipid and carbohydrate metabolism in acatalasemia. *Clinical Chemistry* 2000; 46: 564-566. 13. [\[37\]](#)
13. Góth L. Characterization of acatalasemia detected in two Hungarian sisters. *Enzyme* 1992; 46: 252-258. [\[36\]](#)
14. Góth L, Vitai M. Hungarian hereditary acatalasemia and hypocatalasemia are not associated with chronic hemolysis. *Clinica Chimica Acta* 1995; 233: 75-79. [\[35\]](#)
15. Góth L, Vitai M. The effects of hydrogen peroxide promoted by homocysteine and inherited catalase deficiency on human hypocatalasemic patients. *Free Radicals in Biology and Medicine* 2003; 35: 882-888. [\[33\]](#)
16. Góth L, Dzsuzsák E. HLA-DRB allél típusok meghatározása AMPLICOR eljárással és megoszlásuk vizsgálata hypokatalazémiában. *Klin Kísérl Lab Med* 1997;24: 68-71. [\[34\]](#)
17. Góth L, Sussman H. Új módszerek a molekuláris biológiában: genomiális DNS szeparálás anioncserével, és nem radioaktív DNS detektálás. *Laboratóriumi Diagnosztika* 1993; 20: 274-278. [\[38\]](#)
18. Góth L, Alizadeh BN. Az akatalazémia molekuláris genetikai vizsgálatához szükséges kataláz próba előállítás. *Laboratóriumi Diagnosztika* 1993; 20: 100-104. [\[40\]](#)
19. Góth L, Fodor F, Bíró S. A polimeráz láncreakció (PCR) termékeinek analízise új módszerekkel. *Klin Kísérl Lab Med* 1996; 23: 11-16. [\[39\]](#)
20. Góth L. Mutáció kimutatási módszerek. In Góth L. Molekuláris biológiai diagnosztikai módszerek. Debrecen 2002, Főiskolai jegyzet 46-53.
21. Góth L, Páy A. Genetic heterogeneity in acatalasemia. *Electrophoresis* 1996; 17: 1302-1303. [\[41\]](#)
22. Góth L. Further genetic heterogeneity in acatalasemia. *Electrophoresis* 1997; 18: 1942-1943. [\[42\]](#)
23. Góth L, Alizadeh BN, Sussman HH. Further characterization of Hungarian acatalasemia by HinfI polymorphism of catalase gene. *Enzyme Protein* 1993; 47: 156-159. [\[43\]](#)
24. Góth L, Vitai M. Polymorphism of 5' of the catalase gene in Hungarian acatalasemia and hypocatalasemia. *Electrophoresis* 1997; 18: 1105-1108. [\[44\]](#)
25. Góth L. Genetic heterogeneity of the 5' uncoding region of the catalase gene in human acatalasemic and hypocatalasemic subjects. *Clinica Chimica Acta* 1998; 271: 73-78. [\[45\]](#)
26. Góth L, Rass P, Páy A. Catalase enzyme mutations and their association with diseases. *Molecular Diagnosis* 2004; 8: 141-149. [\[46\]](#)
27. Góth L, Shemirani A, Kalmár T. A novel catalase mutation (a GA insertion) causes the Hungarian type of acatalasemia. *Blood Cells Molecular Diseases Dis* 2000; 26: 151-154. [\[47\]](#)
28. Góth L, Gorzsás A, Kalmár T. A simple PCR-heteroduplex screening method for determination of a common mutation of the catalase gene in Hungary. *Clinical Chemistry* 2000; 46: 1190-1191. [\[48\]](#)
29. Góth L. A novel catalase mutation (a G insertion in exon 2) causes the type B of the Hungarian acatalasemia. *Clinica Chimica Acta* 2001; 311: 161-163. [\[49\]](#)
30. Góth L, Rass P, Madarasi I. A novel catalase mutation detected by polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism, nucleotide sequencing, and Western blot analyses is responsible for the type C of Hungarian acatalasemia. *Electrophoresis* 2001; 22: 49-51. [\[50\]](#)
31. Góth L, Vitai M, Rass P, Sükei E, Páy A. Detection of a novel familial catalase mutation (Hungarian type D) and the possible risk of inherited catalase deficiency for diabetes mellitus. *Electrophoresis* 2005; 26: 1646-1649. [\[51\]](#)

# 6. A VIZSGÁLATI EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE

## 6. 1. A SZÉRUM KATALÁZ

### 6. 1. 1. A H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> féllépcsőpotenciál változása szérum mátrix esetén [1,6]

A szérum tartalmú minták polarográfiája során az tapasztalható, hogy az oxigén és a hidrogénperoxid lépcső féllépcsőpotenciálja negatív irányba eltolódik.

A féllépcsőpotenciál eltolódás a szérum fehérje koncentrációjának növelésével 0,9 V-tól egy határértékig (-1,05 V) tart. Vizsgálataink alapján feltételeztük, hogy a higanycsepp felületén egy fehérjeréteg alakul ki, amelyen a hidrogénperoxid áthaladás többletenergiát igényel, ami a féllépcsőpotenciál eltolódásban jelenik meg.

Ez az eltolódás sem a polarogram alakját, sem annak kiértékelhetőségét nem befolyásolja, de a programozható műszernél ennek figyelembevételével kell a programozást elvégezni.

### 6. 1. 2. A szérum kataláz változása további betegségekben

A kandidátusi értekezésben több megbetegedésben észlelt szérum kataláz aktivitás növekedésről számoltam be. Ebben a fejezetben a kandidátusi értekezés utáni vizsgálataimat értékelem.

#### 6. 1. 2. 1. Szérum kataláz aktivitás növekedés hemolitikus folyamatokban

[2,3,8,9]

Erősen emelkedett szérum kataláz aktivitást tapasztaltunk a vérzéses anémia és extravasculáris hemolízis együttes előfordulásakor.

Baleset után a nagymérvű vérzés révén a szövetközi állományba került a vér. Itt a vörösvértestek hemolízise után a belőlük felszabaduló kataláz enzim a kerigésbe/szérumba került, majd onnan eliminálódott.

A szérum kataláz maximális értéke a referens átlag 5,46-szoros volt. A baleset utáni 8. napon is patológiás tartományban volt a szérum kataláz [2].



A legmagasabb (55-szörös) szérumban kataláz értéket egy hemolitikus uremias szindrómában szenvedő nőbetegnél találtuk, akinél még a felvétel utáni kilencedik napon is 7,7-szeres emelkedés volt tapasztalható. A hemolízis markerei közül a haptoglobin, hematin, methemalbumin, LDH és a szérumban hemoglobin jól korreláltak a kataláz emelkedéssel. A vese működés markerei közül a szérumban karbamid és kreatinin koncentrációk is még a 16. napon is emelkedettek voltak.

A kataláz eliminációs vizsgálat eredménye azt mutatta, hogy az igen nagyfokú szérumban kataláz emelkedésért mintegy 394 ml vér (7,2 %) lehet a felelős [3].

#### **6.1.2.2. A szérumban kataláz aktivitás változása máj betegségeiben [4,7]**

Májbetegségeiben a szérumban kataláz átlagértékéhez viszonyítva legnagyobb átlagos aktivitás emelkedést toxikus hepatitisben és heveny májsorvadásban, kisebb aktivitás növekedést heveny alkoholos hepatitisben és zsírmájban detektáltunk. Máj cirrhosisban és vírus hepatitisben gyakorlatilag nem változott a szérumban kataláz aktivitás.

Ezen két utóbbinál érdemes megjegyezni, hogy a mitokondriális lokalizációjú GPT cirrhosisban csak kismértű, míg vírus hepatitisben nagymértékű (45,2-szeres) emelkedést mutatott. A szérumban kataláz és vírus hepatitis vonatkozásában az irodalom nem egységes, mivel emelkedett, csökkent és változatlan aktivitásokról is beszámoltak.

A szérumban kataláz aktivitások májbetegségeiben korreláltak ( $r: 0,820$ ) mitokondriális lokalizációjú glutamát dehidrogenáz szérumban mérhető aktivitásával.

A kataláz a májban a mikropartikulumokban (peroxiszoma, mitokondrium) lokalizálódik.

Ezek alapján a szérumban kataláz a májbetegségeiben azon formáiban emelkedik meg, amelyek a mikropartikulumok károsodását eredményezik.

A májbetegségeiben a máj a forrása a szérumban kataláz aktivitás növekedésnek, mint ezt a májeredetű enzimekkel történő korreláció támasztotta alá.

Epebetegségeiben a kismértű (1,24-1,51-szeres) szérumban kataláz aktivitás növekedés a betegséghez társuló máj vagy pancreas (cholecystitis) elváltozásoknak tulajdonítható.

A legnagyobb mértű szérumban kataláz aktivitás növekedést (30,2-szeres) egy baleset következtében kialakult májruptúrában tapasztaltuk, ahol a máj ruptúrája során annak enzimeit nagy koncentrációban, közvetlenül jelentek meg a szérumban.



### **6. 1. 2. 3. ROC analízis acute pancreatitisben [9,11]**

Mint korábban kimutattuk [5-8] a szérumban kataláz aktivitás jelentősen emelkedik acute pancreatitisben.

Az acute pancreatitis ROC analízise [9] szemléletesen igazolta azt a korábbi megfigyelést, hogy a kataláz és a lipáz diagnosztikai használhatósága egyértelműen jobb, mint az  $\alpha$ -amilázé. A közel hasonló görbe alatti integrálok (kataláz 0,933, lipáz 0,988) ellenére a nagy enzim aktivitásoknál a kataláz az előnyösebb, míg a kisebb mérvű emelkedéseknél a szérumban lipáznak jobb a klinikai diagnosztikai alkalmazhatósága.

### **6. 1. 2. 4. A szérumban kataláz patológiás gyakorisága [10,10]**

A 3 112 szérumban kataláz vizsgálati eredmény azt mutatta, hogy a patológiás gyakoriság a GOT enzimnél volt a legmagasabb (25,6 %), ezután következett a kataláz (12,6 %), és a legkisebb a GPT esetén volt (10,5 %). Az újonnan detektált csoportok az agónia és a vérzések.

A hosszan tartó agónia sok szervet érint, amelyekből kijutó kataláz, valamint annak csökkent eliminációja révén az enzim a szérumban megszorodik.

A vérzések (gyomor, trauma, műtét) mindig kismérvű hemolízissel járnak, és a szövetek közötti állományban vagy a gyomorban szétesett vörösvértestekből felszabaduló kataláz a keringésbe jut, mint ezt két korábbi példa is bemutatta [2, 3]. Ez a kísérő jelenség növeli a lokális antioxidáns kapacitást, aminek talán az acute pancreatitisnél, acute myocardialis infarctusnál lehet jelentősége.

Ezen megfigyeléseink megerősítik Lef és mtsainak az endotel sejtekre és a szérumban katalázra tett észrevételeit, amit 1992-ben [11] közöltek.

### **6. 1. 3. A szérumban kataláz mérés diagnosztikai hatékonyságának növelése**

A szérumban kataláz aktivitás növekedés nem specifikusan jellemző egy megbetegedésre, hanem több olyan megbetegedés is ismert, amelyekhez szérumban kataláz aktivitás növekedés társul.

Ennek a jelenségnek a bemutatására dolgoztam ki a diagnosztikai hálóban történő ábrázolást. Az ábrán bemutatható szinte tetszőleges számú megbetegedés, az egyes megbetegedésekben mért aktivitások és ezek viszonya a referens tartományhoz/átlaghoz.

Ezután vizsgáltam az enzimológiában használatos azon eljárásokat, amelyek a diagnosztikai specificitás növelésére használatosak.

### **6. 1. 3. 1. Szubsztrát, pH, hőmérséklet függés [12,13,12,13]**

A szérumban hemolitikus-, máj-, szív-, pancreas megbetegedésben és a megfelelő szervekben (vörösvértest, máj, szív, pancreas) található katalázokat hasonlítottam össze azzal a céllal, hogy a szérumban kataláz növekedéséről megállapíthassam, hogy melyik szerv károsodásának eredményeként jelent meg a szérumban.

A maximális reakciósebesség, a  $K_M$  értékek a patológiás szérumban nem mutatottak összefüggést a neki megfelelő szervből származó katalázzal [12], bár a szérumban és szervi katalázok két csoportja elkülöníthető volt.

Hasonló eredményeket kaptunk, amikor a fenti csoportok kataláz aktivitásainak pH és hőmérséklet ( $T_{opt}$  optimális, aktiválási energia,  $T_{50}$ ) függését vizsgáltuk [13]. A jelenség magyarázata a kataláz izoformák detektálásával válik lehetővé, ami a következő fejezetekben történik.

### **6. 1. 3. 2. A szérumban kataláz izoenzimeiről/izoformáiról [14,15,14,15]**

A szérumban kataláz izoenzimeiről/izoformáiról nem voltak irodalmi adatok, ezért először egy módszert dolgoztam ki erre a célra és ezzel folytattam ezen irányú vizsgálataimat.

A vizsgálati eredmények referens és a különböző megbetegedésekben mért patológiás aktivitású szérumban esetén is csak egy, azonos mobilitású kataláz sávot mutattak, ami alapján arra következtettem, hogy a kataláz enzimnek a szérumban nincs sem izoenzime, sem izoformja. A különböző szervekben lévő katalázok szintén egyetlen, azonos mobilitású sávot produkáltak az elektroforetikus elválasztás során. Ennek a sávnak a mobilitása azonban különbözött a szérumbanól.

Ha azonban szérumban katalázhoz vörösvértest hemolizátumot adtunk, akkor a keverék csak egy, a szérumban megfelelő kataláz sávot eredményez.

A két különböző mobilitású csoport (szérumban kataláz vs szervhomogenizátum kataláza) a matrix változtatásával egymásba alakíthatónak minősült, mégpedig reverzibilis módon.

Ezek alapján a két kataláz, a szérumban és szervben lévő, egymásnak olyan izoformái, amelyeknél a molekula alakjának a megváltozása idézi elő a töltés/tömeg alakváltozását. Ezek az izoformák reverzibilisen egymásba alakíthatók, a kataláz tartalmazó közeg mátrixának változtatásával, ami az enzim konformációját változtatja meg.

Ez magyarázhatja a két csoport kissé eltérő viselkedését a szubsztrát, pH és hőmérséklet hatására. Ezen utóbbinak a magyarázatát korábbi (1985, 1987) munkánkban [12,13] ezen fenti újabb (1991) eredmények hiányában, még valamilyen enzim-lipid-membrán asszociációnak tulajdonítottuk.

A konformációs izoformák detektálása a szérumban 1991-ben úttörő jellegű kezdeményezés volt.

A kataláz izoformák detektálásának azonban nem volt diagnosztikai jelentősége, így további vizsgálódások/alkalmazások nem követték.

### **6. 1. 3. 3. A szérumban kataláz differenciál diagnosztikai algoritmus [16,16]**

Ha a szérumban kataláz aktivitás meghatározás eredménye rendelkezésre áll és ez emelkedést mutatott, akkor azt szeretnénk volna tudni, hogy a patológiás érték milyen elváltozásnak, betegségnek, patológiás folyamatnak lehet a következménye. Ehhez egy olyan algoritmust dolgoztam ki, amely a szérumban katalázon kívül szinte rutin laboratóriumi vizsgálatok eredményeit használja fel.

Az algoritmus nagyszámú kataláz és más laboratóriumi vizsgálati eredmény felhasználásával készült 1985-ben az akkor korszerűnek mondható tesztekkel és ezek referens tartományaival, valamint egyes megbetegedésekben mért patológiás átlag értékeivel.

Az algoritmust 1984. januárja és 1985. júniusa között alkalmaztuk a Sümegi Városi Kórház Belgyógyászati Osztályára felvett betegeknél, akiknél a szérumban kataláz 150 kU/l felett volt (326 beteg).

Az algoritmus 150-210 kU/l kataláz aktivitások között 116 esetben (36%) nem tudott eredményt adni, mivel az elsődleges differenciáló paraméterek nem mutattak kóros értékeket, míg közepesen emelkedett (210-450 kU/l) kataláz aktivitásoknál ez mindössze 4,2%-ban fordult elő. A megfelelő válaszcsoport 190 taggal (53%) volt a legnagyobb, és nem elfogadható 20 esetben (6%) volt.

Az 1985-ben úttörő jellegű indukáló algoritmus készítése egy hosszabb ideig stagnáltak, majd napjainkban újraélednek két területen is.

Napjainkban a nagy kapacitású számítógépek, és a visszakereső programok, például a vektor tér modell, segítségével a vizsgálat sokkal hatékonyabban lenne.

A számítógépes laboratóriumi információs rendszerek autovalidációs programjaiban szintén hasonló elven működő algoritmusok segítik a laboratóriumi szakemberek munkáját.

A bizonyítékon alapuló orvoslás (Evidence Based Laboratory Medicine) is ilyen algoritmusokat igényel, és használ fel a gyógyítás érveinek objektív elfogadtatása céljából.

### **6. 1. 4. A szérumban kataláz szervi eredetének vizsgálata**

#### **6. 1. 4. 1. A szérumban kataláz szervi eredetének vizsgálata kontroll egyéneknél [16-18,16,4,18]**

A szoros összefüggés ( $p < 0,001$ ,  $r: 0,995$ ) a szérumban kataláz és a vörösvértestekből származó szérumban hemoglobin között utal a szérumban kataláz egy részének a vörösvértest eredetére.

A regressziós egyenes tengelymetszete (20,4 kU/l) azt mutatja, hogy hemolízis teljes hiányában (amikor a szérumban 0 g/l a vörösvértestekből származó hemoglobin koncentrációja) is van a szérumban kataláz enzim, amely tehát nem a vörösvértestekből származik.

Ha ezt a referens szérumban kataláz átlagára (50,5 kU/l) vonatkoztatjuk, akkor az mondható, hogy kontroll egyéneknél a szérumban kataláz 59,6%-a ( $(50,5 - 20,4) / 50,5$ ) származik a vörösvértestekből, míg a 40,4% más forrásokból.

A más szervekből származó katalázra utal az átlagos kataláz aktivitás és a hemoglobin koncentrációk eltérő aránya is, amely vér esetén 686, míg szérumban ennél magasabb, azaz 856. További megerősítésekre példa májbetegségek, amelyekben májeredetű enzimekkel [4] hasonló kataláz kinetika tapasztalható vagy szív eredetű keringési elégtelenségben a hasonló lokalizációjú glutamát-dehidrogenázal észlelt szoros korreláció [18].

#### **6.1.4.2. A szérumban kataláz eredete patológiás folyamatokban**

##### **6. 1. 4. 2. 1. Fokozott erythropoesis [17,18,4,18]**

A vér hemoglobin kapcsolata a szérumban katalázzal, valamint a szérumban hemoglobinnal fokozott erythropoesis során szintén szoros a korrelációt mutat:  $r: 0,9861$ ,  $p < 0,01$ ,  $r: 0,9892$ ,  $p < 0,01$ .

A fokozott erythropoesis miatt poliglobuliában ( $n: 405$ ), de nagyobb mértékben polycythemia veraban ( $n: 19$ ) a sok a vörösvértest és ezek a fokozott számú ütközései során a sejtek sérülnek. Ezeknek a sejteknek a stabilitása is kisebb, mint a normál vörösvértesteké, és a sérüléskor tartalmuk közvetlenül a plazmába jut. Ezek magyarázzák a szérumban a hemoglobin és a kataláz növekedést a poliglobuliában és polycythemia veraban.

A szérumban hemoglobin és szérumban kataláz arányának ábrázolásakor az összefüggés két különböző meredekségű ( $y = 0,647x + 20,3$  és  $y = 1,791x - 75,28$ ) szakasszal írható le, amelyek kataláz és hemoglobin különböző eliminációs sebességének tulajdonítható. Az *in vitro* hemolízisnél nincs elimináció és itt a hemoglobin koncentráció növekedésével nem változik az iránytangens, az egyenes folytatása a kezdeti egyenesnek.

##### **6. 1. 4. 2. 2. Tranziens folyamatok [17-21,4,18,20,17,19]**

A hemolitikus folyamatokban, acute pancreatitisben, acute myocardialis infarctusban, májbetegségekben, szív eredetű keringési elégtelenségben alkalmaztuk a kataláz release-eliminációs modellt, és a becsléssel kapott eredményekből a következő konklúziók vonhatók le.

Hemolitikus megbetegedésekben a becsült átlagos vörösvértest vesztés egy vérvétellel azonos nagyságrendű, amelynek hiánya a szervezetet nem különösen terheli meg. Természetesen a vörösvértestekből kiszabaduló hemoglobin és más összetevők eközben közvetlenül a keringésbe kerülve más szervekre (vese) káros hatással lehetnek.

Acute pancreatitisben a szérumba került kataláz többszöröse a pancreas kataláz tartalmának, így ez nem lehet a forrás. A párhuzamosan változó hemolízis paraméterek, az elfogadható vér ekvivalens és a pancreatitis szövettani necroticus/hemorrhagias képe alapján állítható, hogy acute pancreatitisben a szérum kataláz forrása a pancreas nedvek által destrukciót szenvedett vörösvértestek.

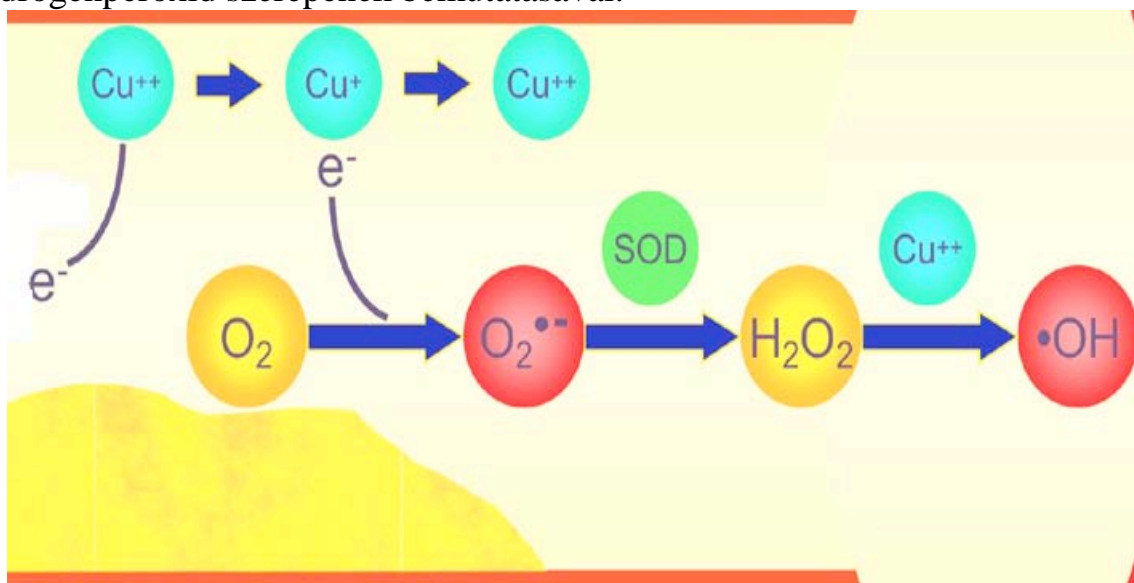
Ebben az új felismerés az, hogy a betegség mindkét formája hemolízissel jár, csak ennek mértéke különböző és a kataláz aktivitás csak indirekt jel, mivel a hemolízis mértékét detektálja.

Mai ismereteink alapján a megbetegedés patomechanizmusában a szabadgyökök révén hidrogénperoxid is keletkezik lokálisan, amely a Fenton reakció révén további szövetkárosodásokért lehet felelős. A hidrogénperoxid csökkentésére a kis kataláz tartalmú pancreas szövet nem képes, ebben segítségére lehet a lokálisan a vörösvértestekből felszabaduló kataláz.

Szíveredetű keringési elégtelenségben sem a szív, hanem a máj lehet a felelős a szérum kataláz növekedéséért.

Az acute myocardialis infarctus is további példaként szolgálhat. Itt sem a szív, hanem más szervek, szövetek károsodása révén nő meg a szérum kataláz aktivitás.

Az acute myocardialis károsodás egyik lehetséges patomechanizmusa [25] a hidrogénperoxid szerepének bemutatásával.



Ebben a folyamatban a hidrogénperoxid koncentráció csökkentés a további károsodások/komplikációk redukálásának lehet a módja azáltal, hogy nem engedi a nagyon toxikus hidroxil gyök képződését.

#### **6. 1. 4. 2. 3. A szérum kataláz eredetére vonatkozó eredményeim összefoglalása**

A vizsgálati eredményeim a klinikai enzimológia eddig nem nagyon vizsgált területein hoztak újabb eredményeket.

Kontrolloknál a szérum kataláz mintegy 60%-a a vörösvértekből, míg a többi része más szervekből származik. Patológiás esetekben a célszerv károsodása vagy a kísérőjelenség (például hemolízis) felelős a szérum kataláz növekedéséért.

Eredményeim alapján arra következtethetünk, hogy egyes patológiás folyamatokban (acute pancreatitis, szíveredetű keringési elégtelenség, acute myocardialis infarctus) a mért klinikai laboratóriumi eredmények nem mindig a célszerv károsodásáról, hanem a kísérő folyamatokról adnak információt, például acute pancreatitisben a kísérő hemolízisről, szíveredetű keringési elégtelenségben a májról.

Ezen vizsgálatok azonban arról nem tájékoztatnak, hogy például hemolízis esetén a vörösvértestek adott százaléka hemolizálódik vagy a sejtek tartalmának adott százaléka jut a keringésbe. Hasonlóan nem ismert ez a jelenség máj pangásban sem.

#### **6. 1. 5. Spektrofotometriás kataláz meghatározási módszer kidolgozása [26,22]**

Az előnyös szempontok ellenére a kataláz meghatározási módszerünket át kellett alakítani spektrofotometriás eljárássá.

Ezt indokolták a spektrofotometriás módszerek majdnem kizárólagos alkalmazása a klinikai kémiai laboratóriumokban, automatizálhatósága és gyorsasága, valamint a polarográfia majdnem teljes kiszorulása a laboratóriumokból, valamint a polarográfia fejlődésének megtorpanása. Napjainkban az elektrokémiai eljárások szinte csak az ion és vérgáz meghatározások (Clark féle oxigén elektród) területén használatosak.

A meghatározás pontossága (within run és day to day) alacsony, referens és emelkedett szérum aktivitások aránya kisebb, mint 5,44%.

A szérum kataláz aktivitás lineáris tartománya 2-101 kU/l közötti.

A meghatározást nem befolyásolták a következő szérum komponensek az alábbi koncentrációkig: foszfát (szérum+puffer) 100 mg/l, bilirubin 191 mg/l, lipid

31,2 g/l, hemoglobin 568 mg/l.

A spektrofotometriás és a korábbi polarográfiás módszer összehasonlítása a referens és az emelkedett kataláz aktivitásoknál jó egyezést mutatott ( $r < 0,9314$ ,  $m < 1,021$ ,  $b < 0,648$ ).

A szérum kataláz aktivitás három nap során szobahőmérsékleten 64,7%-kal, míg +4°C-on 10,5%-kal csökkent. A legkisebb aktivitás csökkenés a –20°C-on történő tároláskor volt tapasztalható, ami 30 napi tárolás esetén mindössze 3,5% volt.

Kereskedelmi kataláz kalibrátor hiányában a szubsztrát hidrogénperoxid koncentrációjának gyakori ellenőrzése titrimetriás (permanganometria) módszerrel ajánlott.

A napi kataláz mérések minőségi kontrollálását keverék szérum napi mérésével és az eredmények Levy-Jennings kontroll kártyán történő ábrázolásával végeztem. A keverék szérum kataláz aktivitása kis térfogatban, lefagyasztva nem változik.

A spektrofotometriás kataláz meghatározási módszer könnyen kivitelezhető, akár mint sorozat mérés, egyszerű a kivitelezése, nem költséges, új műszert nem igényel, mivel minden fotométerhez adaptálható.

Ezek az előnyök tették lehetővé, hogy a veleszületett kataláz hiány első magyarországi kimutatásához a nagyszámú (több 18 000) vér kataláz aktivitás meghatározást elvégezhessük és akatalazémiás családokat találjunk.

1991-ben a szérum kataláz meghatározási eljárást [26] a Web of Science 2005. decemberi adatai alapján 87-szer idézték a nemzetközi szakirodalomban, amelyből 79 a független idézet.

Az eljárást több kutató folyamatosan használja, amit mutat, hogy 7-szer egy szerző, 5-ször öt szerző, 4-szer hat szerző, 3-szor tizenhét szerző, 2-szer negyvenhárom szerző idézte.

Az idéző szerzők a világ több táján találhatóak: Törökországból 25-ször, Estoniából 7-szer, USA-ból 6-szor, Csehországból, Olaszországból 6-ször, Angliából 5-ször, Németországból, Kínából 4-szer, Lengyelországból 3-szor, Japánból és Jugoszláviából 2-szer történt a hivatkozás.

A hivatkozó szerzők közül 58-an egyetemi intézetekben dolgoznak, ami arra utal, hogy főként a kutatásban alkalmazzák és kevésbé a rutin diagnosztikai munkában.

A klinikai kémiai módszer alkalmazási területe elsősorban a medicina és a mikrobiológia, de sikerrel alkalmazzák a növények vizsgálataiban is.

Az idézetek évi megoszlása nagyobb gyakoriságot mutat napjainkban, mint a korábbi években: 2005: 9, 2004: 12, 2003: 9, 2002: 8, 2001: 8, 2000: 6, 1999: 9, 1998: 5, 1997: 3, 1996: 6, 1995: 3, 1994: 0, 1993: 0, 1992: 3.

A leggyakrabban használt kataláz meghatározási eljárások láthatók a következő táblázatban a (Web of Science Cited Reference Indexe alapján, amely 2005. december 30-án készült) mutatta módszerem jó helyezését.

| Szerző(k)           | Hivatkozás | Folyóirat neve   | A közlés éve | Irodalom |
|---------------------|------------|------------------|--------------|----------|
| Beers S, Sizer IW   | 2425       | J Biol Chem      | 1952         | 27       |
| Bergmeyer HU        | 244        | Anal Biochem     | 1955         | 28       |
| Johansson LH        | 95         | Anal Biochem     | 1988         | 29       |
| Góth L              | 87         | Clin Chim Acta   | 1991         | 26       |
| Perschke H, Broda E | 78         | Nature           | 1961         | 30       |
| Gagnon M            | 65         | Anal Chem        | 1959         | 31       |
| Rigo A, Rotilio G   | 44         | Anal Biochem     | 1977         | 32       |
| Bach A, Zubkova S   | 28         | Biochem Z        | 1921         | 33       |
| Cohen G             | 19         | J Neurosci Meths | 1996         | 34       |
| Yasmineh WG et al.  | 13         | Clin Biochem     | 1992         | 35       |
| Slaughter MR        | 12         | Clin Biochem     | 2000         | 36       |

Kereskedelmi forgalomban a SIGMA gyártmányú kataláz aktivitás mérési teszt volt, de ennek gyártását több éve beszüntették, majd újra forgalmazzák. Legújabbán az OxisResearch készített és forgalmaz kutatási célra kataláz kitet. Ezekről még nem áll rendelkezésre értékelhető tapasztalat.

A kataláz aktivitás mérések általános problémái/nehézségei a szubsztrát labilis volta, folyadék formája, amely korrozív és robbanékony. Az egyszerű detektálás az UV tartományban problémás, amikor kataláz tartalmú biológiai mintát, például szérumot, szövet homogenizátumot vizsgálnak és nem tisztított kataláz készítményt. A közvetett módszerek bonyolultak és költségesek.

#### **6. 1. 6. A szérum kataláz referens tartománya [26,22]**

A szérum kataláz diagnosztikai szerepének értékeléséhez szükséges a viszonyítási alap, a referencia tartomány ismerete. A korábbi polarográfiás eljárással több alkalommal határoztunk meg referens tartományt, de ezek nem tükrözték az életkor és a nemek vélhető hatását.

A spektrofotometriás eljárással ezen célból mértük 742 egyén szérum kataláz aktivitását. Külön vizsgáltuk a nőket és a férfiakét és mindkét esetben az életkor függvényében. A spektrofotometriás eljárásnál a szérum hemoglobin mérés segítségével kizártuk a kismértékben hemolizált mintákat.

A nők szérum kataláz aktivitása alacsonyabb ( $p < 0,001$ ), mint a férfiaké és mindkét csoportban a szérum kataláz az életkorral emelkedik. Ez az emelkedés a nőknél nagyobb mértékű (kataláz=0,359xéletkor), mint a férfiaknál (kataláz=0,171x életkor).



A nők alacsonyabb szérumban kataláz aktivitása a vérvizelés miatti alacsonyabb hemoglobin koncentrációjával magyarázható, mivel a szérumban kataláz bizonyos mértékben tükrözi a vér kataláz aktivitását, amely a vörösvértest számmal korrelál.

A nőknél a vérvesztés megszűnése után csökken az anémia és emiatt jobban emelkedhet a szérumban kataláz aktivitása, mint a férfiaknál.

A férfi+nő csoportra talált átlagos szérumban kataláz aktivitás (50,5 kU/l) alacsonyabb, mint a korábban talált 55 kU/l [37], 57 kU/l [38], 56,7 kU/l [39] és 59,9 kU/l [40]. Ennek magyarázata az lehet, hogy a referens csoport definiálása a spektrofotometriás eljárásnál több szempont alapján történt, míg az előző vizsgálatoknál beválogatódhattak olyan egyének is, akiknél valamilyen okból kismérvű szérumban kataláz aktivitás növekedés alakult ki. A spektrofotometriás eljárásnál a szérumban hemoglobin mérés segítségével kizártuk a kismértékben hemolizált mintákat is, ami szintén hozzájárult az alacsonyabb átlagérték kialakulásához.

Az általunk meghatározott referens átlag (50,5±18,1 kU/l, n: 742) magasabb, mint a más reakció körülményeket és mindössze 42 egyén eredményét felhasználó Lamourex [41], aki 1,5±0,6 U/ml aktivitásról számolt be.

Módszerünk és Korolyuk és mtsai [42] módszerének összehasonlítása 81 minta esetén gyenge korrelációt (r: 0,8397) és magasabb átlag értékeket (saját: 51,67±36,79 vs 2,27±1,06) mutatott. A különbséget a két módszer között az magyarázhatja, hogy a Korolyuk féle meghatározás nem az optimális paramétereket alkalmazta az enzimatis reakciónál.

### **6. 1. 7. A szérumban kataláz aktivitás mérés jelentősége**

A humán szérumban kataláz napjainkban rutin klinikai laboratóriumi alkalmazást nem nyert, de közlemények jelennek meg alkalmazásáról folyamatosan. A megjelent közlemények száma a Web of Science kimutatása alapján: 1981-1990: 5 közlemény, 1991-2000: 14 közlemény, 2001-2005 szeptemberig 8 közlemény.

A szérumban kataláz aktivitása és így a szérumban hidrogénperoxidbontó képességének jelentősége a hidrogénperoxid elleni védekezésben limitált, mivel a szubsztrátja nagyon diffúzibilis és a vér vörösvértestjei több nagyságrenddel nagyobb koncentrációban tartalmazzák, bár ennek ellentétét is feltételezik [39]. Lokálisan a vörösvértestek hemolízise révén megnövekedett kataláz koncentráció, ami jól detektálható acute myocardialis infarctusban és acute pancreatitisben, fontos tényező lehet a hidrogénperoxidból képződő reaktív gyökök (Fenton reakció) számának csökkentésében.

2004-ben Manabe és Okada [45] az acute pancreatitisről írt Szerkesztői összefoglalóban a Journal of Gastroenterology hasábjain hivatkoznak az American Journal of Digestive Diseases-ben (1975), a Clinical Chemistry-ben (1982) és a Clinica Chimica Acta-ban (1989) az acute pancreatitisben a szérumban kataláz diagnosztikai jelentőségéről közölt munkáinkra [20, 43, 44].

Fukui és Mtsai [46], akik egy Japánban kifejlesztett szérumban kataláz meghatározási módszert [47] alkalmaztak, amivel acute pancreatitisben vizsgálták a szérumban kataláz diagnosztikai jelentőségét. Vizsgálati eredményeik szinte teljes mértékben megerősítették a mi korábbi eredményeinket [20, 43, 44].

A szerkesztőségi összefoglaló [45] és a fenti közlemény [46] együttes konklúziója az a javaslat, hogy a Japán Egészségügyi Minisztérium (Japanese Ministry of Health and Welfare) az acute pancreatitis súlyosságának megítéléséhez, a korábban (1990) javasolt kritériumai közé újként a szérumban kataláz aktivitást is sorolja be.

Az 1991-ben közölt szérumban kataláz meghatározási eljárást [9] a Web of Science 2005. decemberi adatai alapján 85-szor idézték a nemzetközi szakirodalomban, amelyből 78 a világ különböző országából származó független idézet. Ezek az idézetek a Módszerek fejezetben hivatkoznak az eljárásra, ami azt mutatja, hogy ezt alkalmazzák. Az idézetek napjainkban talán gyakoribbak, mint korábbi években. Több alkalmazóval álltam kapcsolatban, amikor a bevezetés technikai problémáit segítettem megoldani.

## **Irodalom**

1. Góth L, Vitai M, Mészáros I. A hidrogénperoxid polarográfiás féllépcsőpotenciáljának változása a szérumban fehérje mátrixának hatására. Klinikai és Kísérletes Laboratóriumi Medicina 1997; 24: 203-206. [6]
2. Góth L, Vitai M, Mészáros I. Vérzéses anémia és extravaszkuláris hemolízis együttes előfordulása. Laboratóriumi Diagnosztika 1992; 19: 247-249. [8]
3. Góth L, Scheller G. A hemolitikus urémiás szindróma laboratóriumi jelei. Laboratóriumi Diagnosztika 1991; 18: 56-57. [9]
4. Góth L, Mészáros I, Németh H. Serum catalase in liver diseases. Acta Biologica Hungarica 1987; 38: 287-290. [7]
5. Mészáros I, Góth L, Vattay G. The value of serum catalase activity determination in acute pancreatitis. American Journal of Digestive Diseases 1973; 16: 1035-1043.
6. Góth L, Mészáros I, Németh H. Serum catalase enzyme activity in acute pancreatitis Clinical Chemistry 1982; 28: 1999-2000.
7. Mészáros I, Ládics O, Czehelnik R, Góth L, Németh H, Tóth A. Hiperlipémiával együtt észlelt akut pancreatitis. Orvosi Hetilap 1982; 123: 2649-2653.
8. Góth L. A szérumban kataláz enzim aktivitás jelentősége az akut pancreatitis diagnosztikájában. Laboratóriumi Diagnosztika 1984; 11: 132-133.
9. Fazekasné Kis M, Góth L. A ROC analízis alkalmazása az enzim diagnosztikában. Klinikai és Kísérletes Laboratóriumi Medicina 2000; 26:184-186.
10. Góth L, Mészáros I, Németh H. A szérumban kataláz meghatározás diagnosztikai jelentősége. Orvostudományok 1989; 64:257-264. [10]

11. Lef JA, Oppegard MA, Terada LS, McCarty EC, Repine JE. Human serum catalase decreases endothelial cell injury from hydrogen-peroxide. *J Applied Physiol* 1991; 71: 1903-1906.
12. Góth L, Illés E. A különböző eredetű kataláz enzimek hidrogénperoxidbontó képességének függése a hidrogénperoxid koncentrációtól. *Kísérletes Orvostudomány* 1985; 37: 607-612. [\[12\]](#)
13. Góth L. Heat and pH dependence of catalase. A comparative study. *Acta Biologica Hungarica* 1987; 38: 279-285. [\[13\]](#)
14. Góth L. No catalase isoenzymes in serum. *Clinical Chemistry* 1987; 33: 2302-2303. [\[14\]](#)
15. Góth L. Serum catalase: Reversibly formed charge isoform of erythrocyte catalase. *Clinical Chemistry* 1991; 37: 2043-2047. [\[15\]](#)
16. Góth L. Laboratóriumi eredmények diagnosztikai jelentőségének növelése számítógép alkalmazásával, különös tekintettel a polarográfiás kataláz meghatározásra. *Kórház és Orvostechnika* 1986; 26: 150-152. [\[16\]](#)
17. Góth L. A szérumban kataláz eredete egészségeseknél és különböző megbetegedésekben. *Legis Artis Medicinae* 1993; 3: 922-928. [\[4\]](#)
18. Góth L. Origin of serum catalase in healthy subjects and in some hematologic diseases. *Clinical Chemistry and Enzymology Communications* 1989; 1: 329-334. [\[18\]](#)
19. Góth L. Origin of serum catalase in acute liver congestion due to cardiac circulatory failure. *Clinical Chemistry and Enzymology Communications* 1991; 4: 51-56. [\[20\]](#)
20. Góth L. Origin of serum catalase activity in acute pancreatitis. *Clinica Chimica Acta* 1989; 186: 39-44. [\[17\]](#)
21. Góth L. A kataláz enzim és a pancreatitis acuta. *Orvosi Hetilap* 1997; 138: 825-828. [\[19\]](#)
22. Góth L. A szérumban kataláz enzim aktivitásának vizsgálata szíveredetű keringési elégtelenségben. *Magyar Belorvosi Archívum* 1983; 36: 39-46.
23. Góth L, Német H, Mészáros I. A szérumban kataláz enzim aktivitásának változása szívinfarctusban. *Laboratóriumi Diagnosztika* 1982; 9: 99-101.
24. Góth L, Német H, Mészáros I. A szérumban kataláz enzim aktivitása máj- és epebetegségekben. *Laboratóriumi Diagnosztika* 1983; 10: 18-20.
25. Berenshtein E, Mayer B, Goldberg C, Kitrossky N, Chevion M. Patterns of mobilization of copper and iron following myocardial ischemia: a possible predictive criteria for tissue injury. *J Mol Cell Cardiol* 1997; 29: 3025-3034.
26. Góth L. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clinica Chimica Acta* 1991; 196: 143-152. [\[22\]](#)
27. Beers S, Seizer IW. *J Biol Chem* 1952; 195: 133.
28. Bergmeyer HU. *Biochem Z* 1955; 327: 255.
29. Johansson LH, Borg LAH. A spectrophotometric method for determination of catalase activity in small tissue samples. *Anal Biochem* 1988; 174: 331-336.
30. Perschke H, Broda E. *Nature* 1961; 190: 257.
31. Gagnon M, Muntig WM, Esselen B. *Anal Chem* 1959; 31: 144.
32. Rigo A, Rotilio G. Simultaneous determination of superoxide-dismutase and catalase in biological materials by polarography. *Anal Biochem* 1977; 81: 157-166.
33. Bach A, Zubkova S. *Biochem Z* 1921; 125: 263.
34. Cohen G, Kim M, Ogwa V. A modified catalase assay for a plate reader and for the analysis of brain cell cultures. *J Neurosci Methods* 1996; 67: 53-56.
35. Yasmineh WG, Chung MY, Caspers JI. Determination of serum catalase activity on a centrifugal analyzer by an NADP NADPH coupled enzyme reaction. *Clin Biochem* 1992; 25: 21-27.
36. Slaughter MR, O'Brien PJ. Fully-automated spectrophotometric method for measurement of antioxidant activity of catalase. *Clin Biochem* 2000; 33: 52: 124-128.

37. Góth L. Eljárás a vérkonzervek hemolízisének meghatározására. *Transfusio* 1977: 18: 124-128.
38. Góth L. Determination of catalase enzyme activity in human tissues by programmable polarograph. *Hungarian Scientific Instruments* 1983: 53: 43-46.
39. Góth L, Mészáros I. Polarographic determination of serum catalase activity. *Hungarian Scientific Instruments* 1975: 32: 13-16.
40. Góth L. Szérum kataláz enzim aktivitás meghatározás programozható polarográfval. *Kórház és Orvostechnika* 1982: 20: 6-9.
41. Lamourex G, Bourdeau S, Dubois G, Charbonneau R, Gagnon M, Grad BR. A rapid method for determining catalase in human blood. *Clin Chim Acta* 1987: 167: 105-111
42. Korolyuk MA, Ivanova LI, Maiorova IG, Tokarev VE. A method for measuring catalase activity. *Lab Delo* 1988: 16-19 (Russian).
43. Góth L, Mészáros I, Németh H. Serum catalase enzyme activity in acute pancreatitis. *Clinical Chemistry* 1982: 28: 1999-2000.
44. Mészáros I, Góth L, Vattay G. The value of serum catalase activity in acute pancreatitis. *Am J Dig Dis* 1973: 18: 1035-1040.
45. Manabe T, Okada Y. Serum markers for prediction the severity of acute pancreatitis. *J Gastroenterol* 2004: 39: 504-506.
46. Fukui M, Kanoh M, Takamatsu Y, Arakawa Y. Analysis of serum catalase activities in pancreatic disease. *J Gastroenterol* 2004: 39: 469-474.
47. Iwamura J, Tanaka H, Takeuchi M, Hosotsubo H. Quantitative analysis of catalase activity in human serum (in Japanese). *J Med Technol* 1991: 35: 1347-1350. és 1993: 37: 87-90.

## 6. 2. VÖRÖSVÉRTEST KATALÁZ

### 6. 2. 1. A vérsejtek kataláz tartalma

A vörösvértest és vér kataláz, bár nem azonos fogalmak, de gyakran azonos értelemben használja őket az irodalom.

Az egyes vér alkotók kataláz aktivitása (U) fiziológiás térfogati viszonyok esetén is jelentősen változó: a vörösvértesteké 251 177 kU/l [1], a plazmáé 47,9 kU/l [2], a fehérvérsejteké és a trombocitáké kevesebb, mint 100 kU/l [3, 4].

A vér kataláz 99,93%-a vörösvértestekben, 0,001%-a a fehérvérsejtekben, 0,001%-a a trombocitákban, és 0,067%-a a plazmában található.

Ezek az adatok azt mutatják, hogy a vér kataláz több, mint 99%-a a vörösvértestekből származik, tehát mindkét elnevezés (vér, vörösvértest) használható.

A félkvantitatív flow cytometriás vizsgálati eredmények is azt mutatták, hogy a vérsejtek kataláz tartalma a következő sorrendben csökken:

vörösvértest > polimorf nuclearis sejt > monocita > lymphocita, trombocita.

A flow cytometriás vizsgálat még azt is mutatja a kataláz lokalizációját, ami a vörösvértestek, lymphociták, trombociták esetén elsődlegesen a vérsejtekben, míg a monociták és a polimorf nuklearis sejteknél ezek felszínén is detektálható

### **6. 2. 2. A vér kataláz meghatározási módszere [1,2,5,25,22,29]**

A vér kataláz meghatározáshoz a szérum kataláz mérésre kidolgozott hidrogénperoxid mérési eljárásunkat [2] alkalmaztuk, amelyet a vér magas kataláz aktivitása miatt módosítottam [5]. A nagy kataláz koncentráció és a nagy specifikus aktivitás miatt a kataláz aktivitást M (10<sup>6</sup>) U per liter (vér)-ben adjuk meg.

A meghatározás sorozaton belüli pontossága elfogadható, mint ezt a következő variációs koefficiens értékek mutatják: sorozaton belüli CV=3,1% (67,0±1,43 MU/l, n: 21), míg a sorozatok (napok) közötti pontossága CV=5,1% (80,3±2,49 MU/l, n: 22).

Kereskedelmi kataláz kalibrátor hiányában a szubsztrát hidrogénperoxid koncentrációjának gyakori ellenőrzése titrimetriás (permanganometria) módszerrel ajánlott.

A napi kataláz mérések minőségi kontrollálását keverék hemolizátum napi mérésével és az eredmények Levy-Jennings kontroll kártyán történő ábrázolásával végeztem.

A módszer alapja, kivitelezhetősége és jellemezhetősége azonos a szérum katalázéval.

### **6. 2. 3. A vér kataláz referens tartománya [1,25]**

A vér kataláz referens tartományának meghatározásához 880 nő és 876 férfi vizsgálati eredményeit használtuk fel, akiknek a kiválogatása az eredmények fejezetben leírt szempontok alapján történt.

A referens tartomány megadása nemek és korcsoportok alapján történt a megadva a vér kataláz és a vér kataláz/vér hemoglobin értékeket.

A nők átlagos vér kataláza szignifikánsan (p<0,001) alacsonyabb, mint a férfiaké (107,7±14,4 MU/l vs 117,9±16,9 MU/l), míg a kataláz és hemoglobin arány nem változott (p>0,1) azaz 0,841±0,119 és 0,841±0,107.

A referens egyének vér kataláz aktivitása (m férfiak:-0,084 nők:-0,016), kataláz/hemoglobin aránya (férfiak:0,00029, nők:-0,00010) igen kis mértékben, de különbözőként változik férfiaknál és nőknél az életkor függvényében.

A nők alacsonyabb vér kataláz aktivitása a periodikus vérvesztésük miatti alacsonyabb vörösvértestszámmal magyarázható, amit az is indokol, hogy a kataláz/hemoglobin arányuk közel azonos volt a férfiakéval. Ez magyarázhatja azt is, hogy a nők vér kataláza kisebb mértékben csökken, főként a menopausa után.

Az általunk talált referens tartományok (82,3-148,6 MU/l, n: 1756) kissé magasabbak, mint Guemouri által (73,6-125,9 MU/l, n: 1836) közölt referens tartomány [6].

Nagyobb az eltérés és főként a tartomány alsó határában, amikor Aebi [7] által korábban (1974) közölt tartománnyal történt az összehasonlítás. Ennek részleges magyarázata lehet az általunk használt magasabb szubsztrát koncentráció, és az Aebi által használt egység konverziója MU/l-é.

A mi eredményeinket szinte teljes mértékben megerősítette Mitrea és Cojocaru 1999-ben [8], mint ezt a következő táblázat mutatja:

| Vér kataláz aktivitás (MU/l) | Vitai és Góth [1] | Mitrea és Cojocaru [8] |
|------------------------------|-------------------|------------------------|
| Férfi+Nő                     | 113,3±16,5        | 115,3±14,5             |
| Nők                          | 107,9±14,5        | 108,7±12,4             |
| Férfiak                      | 117,9±16,9        | 118,9±16,6             |

A vér kataláz referens tartományának elemzését elvégezve [9] az újabb statisztikai, számítógépes eljárásokkal (Kolgomorov-Smirnov teszt SPSS számítógépes analízissel, percentiles analízis, 90%-os konfidencia limit meghatározás, alcsoportok vizsgálata, IFCC ajánlás) a következő eredményeket szolgáltatva.

A vér kataláz aktivitás a csoport átlagok alapján számolva mindkét nemnél nem szignifikáns ( $p > 0,258$ ) csökkenést (m értéke férfiaknál: -0,088, nőknél: -0,024) mutatott az életkorral. Ez a csökkenés a férfiaknál szorosabb korrelációt ( $r = -0,897$ ) eredményezett, mint a nőknél ( $r = -0,481$ ).

A férfiak és nők vér kataláza Gaussi eloszlást mutat és külön referencia tartomány megadását igényli. A férfiak+nők esetén nem Gaussi az eloszlás.

A következő táblázat tartalmazza az egyes csoportok referencia tartományait a 2,5%-, 50,0%-, 97,5%-os percentilisek és az IFCC ajánlása ( $x \pm 1,96$  SD) alapján.

| <b>A vér kataláz referens tartománya</b> |                   |                  |                    |
|--|-------------------|------------------|--------------------|
| <b>MU/l</b>                              | <b>Alsó határ</b> | <b>Közéérték</b> | <b>Felső határ</b> |
| <b>FÉRFIAK</b>                           |                   |                  |                    |
| Percentilis                              | 85,3              | 119,3            | 151,5              |
| $x \pm 1,96SD$                           | 84,9              | 117,9            | 150,8              |
| 90% konfidencia                          | 84,4              |                  | 135,9              |
| Korábbi [1]                              | 81,9              | 117,9            | 153,9              |
| <b>NŐK</b>                               |                   |                  |                    |
| Percentilis                              | 78,5              | 107,5            | 134,7              |
| $x \pm 1,96SD$                           | 79,5              | 107,7            | 135,9              |
| 90% konfidencia                          | 77,0              |                  | 135,8              |
| Korábbi [1]                              | 78,9              | 107,7            | 136,5              |
| <b>FÉRFIAK+NŐK</b>                       |                   |                  |                    |
| Percentilis                              | 81,4              | 113,5            | 145,1              |
| Korábbi [1]                              | 82,3              | 113,5            | 148,6              |

Ezek az újonnan meghatározott referens értékek közel azonosak voltak az előző közleményben [1] bemutatottal. A kismérvű eltérést magyarázhatja a referencia tartomány meghatározására használt új IFCC ajánlás, amely az eredmények 95%-át használja fel a referens tartomány kijelölésére. Gaussi eloszlás esetén ez  $x \pm 1,96SD$ -t jelent, míg a korábban az  $x \pm 2,0SD$  képletet ajánlotta az IFCC.

#### **6. 2. 4. A vér kataláz aktivitás különböző megbetegedésekben**

Egy 3 éves vizsgálati program keretében 28 252 beteg vér katalázát határoztuk meg (Laboratórium, Városi Kórház, Sümeg) és kerestük azokat a megbetegedéseket, folyamatokat, amely csökkent vér kataláz aktivitással járnak. Ezeket a vizsgálatokat tovább folytatva a Debreceni Egyetem, Orvos- és Egészségtudományi Centrum, Klinikai Kémiai Intézete, ma Klinikai Biokémiai és Molekuláris Patológiai Intézet, valamint a Klinikai Kémiai Analitikai Tanszék közreműködésével.

A vér kataláz aktivitásának csökkenését különböző megbetegedésekben az általam szerkesztett diagnosztikai háló szemlélteti.

A vér kataláz csökkenést a következő megbetegedésekben tudtuk kimutatni.

##### **6. 2. 4. 1. Anemiák [10,26]**

2 884 anemias beteg mutatott szignifikánsan ( $p < 0,005$ ) csökkent vér kataláz ( $83,7 \pm 16,4$  MU/l) aktivitást. Ez a kataláz aktivitás korrelált a vér hemoglobin koncentrációval ( $y_{\text{vérkataláz}} = 0,683x_{\text{vérhemoglobin}} + 18,16$ ,  $r: 0,6954$ ).

Az anemiák egyes eseteiben kialakuló kataláz hiány elérheti akár az 50%-ot vagy még ennél alacsonyabbat is, és ezek az állapotok hosszabb ideig is eltarthatnak. Jelen ismereteink szerint a vér kataláz nemcsak a vörösvértestekben képződő extra hidrogénperoxid eliminálja, hanem a más helyeken keletkezőké is. A hosszantartó anemianak tulajdonítható kataláz hiány például a szabadgyökök elleni védekező mechanizmus ezen láncszemének jelentős gyengülését is eredményezheti és ekkor a szabadgyökök ki tudják fejteni patológiás aktivitásukat

##### **6. 2. 4. 2. Tumorok [10,26]**

130 különböző tumorban (hematológiai: 30, gastrointestinalis: 29, tüdő: 17, urogenitalis: 14, emésztőszervi: 14, emlő: 13 és vegyes: 13) és annak különböző fázisaiban (IUCC szerint T: 2,6, N: 2,3, M: 2,1) szenvedő beteg vér kataláz aktivitásait vizsgáltuk. Az átlagos vér kataláz aktivitás szignifikáns ( $p < 0,001$ ) csökkenést mutatott ( $80,8 \pm 21,5$  MU/l). A betegek 49,2%-nak a referens tartomány alsó határa alatt volt a vér kataláz aktivitása.

Annak eldöntésére, hogy ez a vér kataláz aktivitás csökkenés a tumoros betegek anémiajanak (tumoros:  $112,5 \pm 18,9$  g/l, kontroll:  $133,4 \pm 11,6$  g/l), a tumornak vagy mindkettőnek tulajdonítható, vizsgáltuk a vér hemoglobin és vér kataláz összefüggést kontrolloknál és tumoros betegeknél.

A két egyenes iránytangensének különbsége (0,682 és 0,573) azt mutatja, hogy az anémián túlmenően a tumoros folyamat is felelős a csökkent kataláz aktivitásáért.

A korábbi fejezetben az irodalmi adatok a kataláz aktivitás csökkenést a máj esetében egyértelműen a kataláz szintézis csökkenésének tulajdonították. A vér kataláz csökkenés a tumor révén csökkent kataláz szintézisnek és tumorban kialakuló anémianak tulajdonítható.

Tumorok esetén mérhető vér kataláz aktivitásokról eltérőek az adatok az irodalomban.

Hasonló eredményekről Saito és mtsai [11] számoltak be, míg ettől eltérőeket tapasztalt Bewick csoportja [12]. Az eltérések magyarázata lehet, hogy mi az anémia hatását külön elemeztük és vettük figyelembe, illetve többfajta tumor vizsgálatából vontuk le következtetésünket.

#### **6. 2. 4. 3. Atherosclerosis [10,26]**

A vér kataláz aktivitás változását elsőként vizsgáltuk nagyszámú (1670) atherosclerosisos betegnél. A vizsgálati eredmények szignifikánsan ( $p < 0,001$ ) csökkent ( $104,8 \pm 18,2$  MU/l) vér kataláz mutattak. A referens tartomány alatti vér kataláz a betegek 4,9 %-ában volt kimutatható.

A vér kataláz aktivitás csökkenés nem korrelált a betegség klinikai súlyosságával. A betegek és a kontrollok vér hemoglobinja nem mutatott szignifikáns ( $p > 0,78$ ) eltérést.

#### **6. 2. 4. 4. Schizophrenia [10,26]**

Schizophreniában is elsőként vizsgáltuk a vér kataláz aktivitását és kaptunk szignifikáns ( $p < 0,001$ ) csökkenést ( $105,6 \pm 20,5$  MU/l, n: 275), és közel 10%-ban volt a kataláz aktivitás a patológiásan alacsony tartományban.

A szizophrenia különböző típusai (paranoid, reactive, residual) nem eredményeztek különbséget a vér kataláz aktivitásban.

A betegek és a kontrollok vér hemoglobinja nem mutatott szignifikáns ( $p > 0,89$ ) eltérést.

#### **6. 2. 4. 5. Diabetes mellitus [13-15,28,27,46]**

A diabetes mellitus 3 formájában (1-es típus, 2-es típus és gestacios) vizsgáltuk a vér kataláz aktivitást. A diabetes mindhárom formájában



szignifikánsan ( $p < 0,001$ ) csökkent ( $93,6 \pm 22,2$  MU/l,  $95,8 \pm 17,1$  MU/l, n: 92 és  $73,6 \pm 19,4$  MU/l, n: 60) vér kataláz aktivitásokat találtunk .

A terheseknél [8] a hasonló korú nem terhes nőkhöz viszonyítva csökkent vér kataláz aktivitás detektálható ( $109,2 \pm 13,3$  MU/l, n: 235 vs  $89,1 \pm 18,4$  MU/l, n: 169,  $p < 0,05$ ). A gestacios diabeteses nők vér kataláza még a nem diabeteseseknél, terheseikénél is alacsonyabb ( $73,6 \pm 19,4$  MU/l, n: 60,  $p < 0,05$ ) volt. Ezen utóbbi kataláz csökkenés nem tulajdonítható a terhességi anémianak, mivel a vér hemoglobin a terheseknél ( $120,4 \pm 10,2$  g/l, n: 169), és a gestacios diabeteseseknél ( $118,1 \pm 10,5$  n: 60) nem mutatott szignifikáns ( $p > 0,2$ ) változást.

A terhesség 2. trimeszterében a vér kataláz szignifikánsan ( $p < 0,05$ ) alacsonyabb ( $62,1 \pm 18,3$  MU/l) mint a 3. trimeszterben ( $80,4 \pm 15,3$  MU/l). A hemoglobin  $A_{1c}$  viszont a 2. trimeszterben volt magasabb ( $5,7 \pm 0,6\%$ ), mint a 3.-ban ( $5,1 \pm 0,8\%$ ).

A csökkent vér kataláz aktivitás terhességi diabetesben nem növelte a terhességi komplikációk (gestacios idő, születési súly, Caesarian sectio, respiratory distress syndroma, nagy születési súly,  $p > 0,05$  minden esetben) kockázatát. Az anyák közül 53 minden komplikáció nélkül viselte a terhességet. Az a 7 terhes, aki később szült, mint a közlemény elfogadásra került, szintén komplikáció nélküli volt.

Az ismert kataláz gén mutációk [15] sem gestacios, sem 1-es, 2-es típusú diabetes mellitusban nem voltak kimutathatóak. Ezért a genetikai ok hiányában úgy véljük, hogy a csökkent kataláz szintézisnek tulajdonítható a vér kataláz csökkenése [16].

A terhességben kialakuló diabetes csökkentheti a kataláz szintézist, a diabetes felismerése és a terápia a szénhidrát metabolizmus rendezése révén mérsékli a kataláz szintézis csökkenését. Ez terhességi diabetesben egy új felismerés, azonban a mechanizmus, amely ezért a változásért felelős, nem ismert.

#### **6. 2. 4. 6. Vitiligo**

A vitiligo, amelynek patomechanizmusában a lehetséges okozók között a szabadgyökök is szerepelnek, a vér kataláz vizsgálata szintén szignifikáns ( $p < 0,001$ ) csökkenést ( $100,2 \pm 17,7$  MU/l, n: 75) mutatott.

Nem volt szignifikáns ( $p > 0,07$ ) összefüggés kimutatható a vér kataláz és a vitiligo fennállása, a repigmentizáció, a családi halmozódás, a vitiligo kiterjedtsége és a Fitzpatrick bőrtípus között.

Csökkent vér kataláz aktivitásról vitiligóban még nem, de vitiligos betegek epidermisen már beszámoltak [17].

Ebben a megbetegedésben hasonlóan a diabetes mellitushoz az ismert kataláz gén mutációk [15, 18], amelyek felelősek lehetnek az enzim aktivitásának csökkenéséért, nem voltak kimutathatók.

## 6. 2. 5 A humán vörösvértest kataláz tisztítása [19,24]

A kutatásaimhoz szükségesnek tartottuk összehasonlítási célból tisztított humán eredetű kataláz enzimet felhasználni. Az 1980-90-es években a kereskedelemben kizárólag csak marhamáj kataláz volt vásárolható tisztított formában (Sigma, Boehringer és Reanal).

Ezért úgy döntöttünk, hogy humán vörösvértestekből készítünk tisztított kataláz enzimet. Ehhez Mörikoffer-Zwez [20] eljárásából kiindulva saját módszert dolgoztam ki.

Az általam tisztított vörösvértest kataláz több tekintetben hasonló tulajdonságú, mint a marhamáj kataláz, néhány jellemzőjében (elektroforetikus mobilitás, molekulatömeg) eltérés tapasztalható és a tisztított termék minőségét jellemző paraméterekben (E405/280, specifikus aktivitás) a vörösvértest kataláz jobbnak mutatkozott.

A humán kataláz és a marhamáj kataláz eltérő elektroforetikus mobilitása és SDS-PAGE elektroforézissel meghatározott molekula tömegének magyarázata az eltérő aminosavak (humán kataláz alegységenkénti 527 aminosav, marhamáj kataláz 506 aminosav) lehetnek.

Napjainkban az eltérés további tanulmányozására végeztük el a MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ion) tömegspektrometria analízist és a mikrokapillaris (chip) elektroforézist a két tisztított készítmény vizsgálatára.

Az új vizsgálati eredmények megerősítik korábbi eredményeinket a két készítmény eltérő molekulatömegére vonatkozóan.

A tisztított humán vörösvértest kataláz alegységek különböző módszerekkel mért (SDS-Page 69 kDa, Chip (Agilent: 64,9 kDa, BioRad: 58, MALDI-TOF: 58,9 kDa) eltérő molekula tömegei a korábban leírt konformációs változásoknak tulajdoníthatók [21]. A különböző eljárások során különböző előkészítő műveletek, illetve eltérő mátrixú elválasztó közegekben történik a szétválasztás és ezek hatására az alegység különböző konformációs változásokat szenved el.

Ezek a konformációs változások a szérumban lehetőséget adhatnak, az enzim receptoroknak a felismerésre és az eliminációra.

Napjainkban már az OxisResearch [22] forgalmaz tisztított humán vörösvértest katalázt, de az általuk gyártott specifikus aktivitása (50 kU/mg) nem éri el az általam tisztított katalázét (206 kU/mg).

### Irodalom

1. Vitai M, Góth L. Reference ranges of normal blood catalase activity and levels in familial hypocatalasemia in Hungary. *Clinica Chimica Acta* 1997; 261: 35-42. [25]
2. Góth L. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clinica Chimica Acta* 1991; 191:143-151. [22]
3. Olafsson T, Olafsson I. Purification of human granulocyt catalase in chronic myeloid leukemia. *Biochem Biophys Acta* 1977; 482: 301-308.

4. Seghieri G, Simplicio P, Aninchini R, Alvigi L, De Bellis A, Bennardini F, Franconi F. Platelet antioxidant enzymes in insulin dependent diabetes mellitus. *Clin Chim Acta* 2001: 309: 19-23.
5. Góth L. Two cases of acatalasemia in Hungary. *Clinica Chimica Acta* 1992: 207: 155-158. [\[29\]](#)
6. Guermouri L, Artur Y, Herbeth B, Jeandel C, Cuny G, Siest G. Biological variability of superoxidase dismutase, glutathione peroxidase, and catalase in blood. *Clin Chem* 1991: 37: 1932-1937.
7. Aebi H. Catalase. In: Bergmeyer HU. Ed. *Methods of enzymatic analysis*. Vol 2. Verlag Chemie, Weinheim, 1974, p 673-678.
8. Mitrea CM, Cojocaru M. Catalase in insulin-dependent diabetes mellitus. *Klin Kísérl Lab Med* 1999: 26: 128 (P/10).
9. Vitai M, Sükei E. A vér kataláz referencia tartományának vizsgálata. *Klin Kísérl Lab Med* 2004: 31: 89-95.
10. Góth L. Hypocatalasemia in hospital patients. *Clinical Chemistry* 1996: 42: 341-342. [\[26\]](#)
11. Saito T, Kurasaki H, Kasi H, Sato K. Deficiency of erythrocyte superoxide dismutase and catalase activities in patients with malignant lymphoma and acute myeloid leukemia. *Cancer Lett* 1984: 24: 141-146.
12. Bewick M, Coutie W, Tudhope GR. Superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase in the red cells of patients with malignant lymphoma. *Brit J Hematol* 1987: 65: 347-350.
13. Góth L, Lenkey A, Bigler NW. Blood catalase and diabetes in Hungary. *Diabetes Care* 2001: 10: 1839-1841. [\[28\]](#)
14. Góth L, Tóth Z, Tarnai I, Berces M, Török P, Bigler WN. Blood catalase activity in gestational diabetes: activity is decreased but not associated with pregnancy complications. *Clinical Chemistry* 2005: 51: 2401-2404. [\[27\]](#)
15. Góth L, Rass P, Pay A. Catalase enzyme mutations and their association with diseases. *Molecular Diagnosis* 2004: 8: 141-149. [\[46\]](#)
16. Sindhu RK, Koo JR, Roberts CK, Vazioori ND. Dysregulation of hepatic superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in diabetes: responses to insulin and antioxidant therapies. *Clin Exp Hypertens* 2004: 26: 43-53.
17. Schallreuter KU, Wood JM, Berger J. Low catalase levels in the epidermis of patients with vitiligo. *J Invest Dermatol* 1991: 97: 1081-1085.
18. Casp CB, She JX, McCormack WT. Genetic association of the catalase gene (CAT) with vitiligo susceptibility. *Pigment Cell Res.* 2002: 15: 62-66.
19. Góth L. Human erythrocyte catalase, Isolation with an improved method, Characterization and comparison to bovine liver catalase. *Enzyme* 1989: 41: 191-199. [\[24\]](#)
20. Mörkoffer-Zwez S, Cantz M, Kauffman H, Wartburg PJ, Aebi H. Heterogeneity of erythrocyte catalase. *Eur J Biochem* 1969: 11: 49-57.
21. Góth L. Serum catalase: Reversibly formed charge isoform of erythrocyte catalase. *Clinical Chemistry* 1991: 37: 2043-2047. [\[15\]](#)
22. Catalase, Human Erythrocyte. Cat No.25432. OxisResearch. Portland, Oregon, USA.

## **6. 3. A MAGYARORSZÁGI AKATALAZÉMIA**

### **6. 3. 1. A magyarországi akatalazémia/hypokatalazémia felfedezése**

**[1-8,22,25,30,29,32,31,46,4]**

A spektrofotometriás vér kataláz meghatározási módszer és a referens tartomány birtokában [1, 2] vállalkoztunk arra, hogy elsőként Magyarországon, veleszületett kataláz hiányos egyéneket keressünk és ezek klinikai, klinikai kémia, molekuláris genetikai vizsgálatát elvégezzük.

A vér kataláz vizsgálatokat 1989-ben kezdtük és folytattuk 1992-ig. Ezen idő alatt mintegy 22 152 egyén vér katalázát határoztuk meg és értékeltük. A vizsgált egyének életkora 14 és 96 év közötti és 54,1%-uk nő, míg 45,4% -uk férfi volt [3].

Az első akatalazémiát (vér kataláz 4,6 MU/l, ami a referens átlag 4,0%-a) 1989-ben, míg a másodikat (vér kataláz 7,6 MU/l, ami a referens átlag 6,7%-a) 1991-ben detektáltuk két nőnél, akik testvérek. Ezután a család többi tagját (6 hypokatalazémiás és 9 normokatalazémiás családtag, 3 generációban) is bevonva a vizsgálatokba, elkészítettük az első magyarországi akatalazémiás családról vizsgálati eredményein alapuló első közleményünket [4]. Ez volt a világon az 59. akatalazémiás család és a két nő testvér a 177. és 118. akatalazémiás egyén.

A magyarországi akatalazémiás családon kívül további 13 hypokatalazémiás családot 64 hypokatalazémiás (vér kataláz átlag:  $61,3 \pm 9,9$  MU/l, 60,8% és 68 normokatalazémiás ( $100,7 \pm 9,6$  MU/l, 100%) családtaggal detektáltunk.

A vér kataláz referens átlagára vonatkoztatva az akatalazémiások vér kataláza 4,0% és 6,7%, ez valamivel magasabb, mint a Japánban és Svájcban talált 0-3,2%, ami talán az eltérő mérési módszereknek is tulajdonítható.

A hypokatalazémiások átlagos vér kataláza a katalázhiányos családok normokatalazémiás családtagjainak átlaghoz viszonyítva 60,8%, ami hasonló a japán hypokatalazémiásokéhoz (56,9%), de kissé alacsonyabb a svájci hypokatalazémiásokénál (60-80%).

### **6. 3. 2. Az örklődő kataláz hiány klinikai jellemzői [3-8,30,29,32,31,46,4]**

#### **6. 3. 2. 1. A nemek aránya**

Érdekes megfigyelés, hogy veleszületett kataláz hiányban a nő és férfi arány Japánban (1,13: 1) és Svájcban (0,83: 1) közel azonos, azaz 1:1 körüli, addig Magyarországon a nők aránya jelentősen magasabb 1,63: 1.

#### **6. 3. 2. 2. A veleszületett kataláz hiány földrajzi lokalizációja**

Az első magyarországi kataláz hiányos egyének a Nyugat Dunántúli vizsgálati területen élő lakosok voltak. Bár az M. család tagjai is itt ebben a

régióban élnek, de a proband születése helye Erdély, a Nagyvárad melletti Pécska község, ahonnan a II.világháború alatt költözött ide és telepedett le, míg testvérei és szülei ma is Nagyvárad mellett élnek.

A D. család, amelynek egy tagja vitiligóban szenved, a vitiligos betegek vizsgálatakor került detektálásra. Ez a család Hajdú-Bihar megyében él.

A veleszületett kataláz hiány tehát Magyarországon több régiójában detektálható.

### **6. 3. 2. 3. A veleszületett kataláz hiány gyakorisága Magyarországon**

Az akatalazémia gyakorisága Magyarországon 0,05/1000. Ez hasonló a Svájci típuséhoz (0,04/1 000), de alacsonyabb a Japán típusénál (0,08/1000).

A mutáns allél(ok) gyakorisága 0,307%.

A magyarországi adatot extrapolálva az mondható, hogy 20 000 lakos között van egy akatalazémiás, akik száma Debrecenben 10 és Magyarországon mintegy 500 lehet, ha Debrecen lakosainak számát 200 000-nek és Magyarországot 10 000 000-nak vesszük.

A hypokatalazémia magyarországi gyakorisága 0,18/1000, ami jelentősen alacsonyabb a Japánban talált 0,40/1000. Ezek alapján Debrecenben 36, Magyarországon 1 800 hypokatalazémiás élhet.

Összegezve, Magyarországon a veleszületett katalázhiány mintegy 2 300 lakost érinthet.

### **6. 2. 3. 4. A veleszületett kataláz hiányos egyének betegségei és életkora**

1989-től 2004-ig a következő elváltozásokat tapasztaltuk a veleszületett kataláz hiányos egyéneknél, kivéve a diabetes előfordulását, amelyet külön részben vizsgálunk.

Az első akatalazémiás nő 62 éves korában exitált (1991). A halál oka adenocarcinoma coli és ennek szövődményei voltak. A különböző tumorok csökkentik a vér kataláz aktivitást, de ennek hozzájárulása a kataláz csökkenéshez jóval kisebb mértékű [9].

A hypokatalazémiások közül 1989 óta elhalálozott 4 személy, akiknél a sectio a következőket találta:

- a. hypokatalazémiás nő, élt 73 évet: arteriosclerosis universalis,
- b. hypokatalazémiás férfi élt 73 évet: cerebrovascularis lesio,
- c. hypokatalazémiás férfi élt 46 évet: diabetes komplikációi,
- d. hypokatalazémiás férfi élt 77 évet: prostata carcinoma.

Mind az öt betegnél a sectio során az életkorukhoz viszonyított, fokozott mértékű arteriosclerosis volt látható az erekben.

A hypokatalazémiások közül egy scizophreniában szenved.

Ezen kevés számú adat statisztikai analízishez ugyan nem elegendő, de az arteriosclerosis fokozódására és a rosszindulatú daganatok nagyobb

gyakoróságára következtetni engednek. Ezt a megfigyelést támaszthatta volna alá az egyik hypokatalazémiás család, ahol fokozottan fordult elő tumor. Ezen tumoros egyének a kataláz vizsgálat kezdete előtt exitáltak.

A Takahara tünetre utalás egy esetben történt, míg a többi személynél nem volt megtalálható.

Az átlagéletkor a kataláz hiányos egyéneknél  $45,1 \pm 19,3$  év (n: 61, 6-86 év), ami valamivel magasabb (p: 0,419), mint ugyanezen családok normokatalazémiás családtagjaié, amely  $42,1 \pm 18,5$  év (n: 66, 7-77 év).

Az akatalazémiások életkoráról nem találhatók irodalmi adatok humán vonatkozásban.

Az egyéb élőlények viszonylatában azonban több közlemény foglalkozik az élettartam és kataláz koncentráció, illetve a kataláz overexpresszió az élettartamra gyakorolt hatásával. Az adatok azonban ellentmondásosak, mint ezt a következő példa mutatja nagy IF-ú folyóiratokban megjelent közlemények alapján.

Taub és mtsai 1999-ben NATURE-ben írják le, hogy a C-elegans *daf-C* and *Clk-1* mutánsok citoszoljában lévő kataláz védőhatásának következtében megnő az élettartam. Ezt a közleményt 123-szor idézték [9].

2003-ban a szerzők egy NATURE korrekcióban elismerik, hogy sem ők, sem mások az 1999-es közleményben ismertett kísérleteket nem tudták reprodukálni [10].

Egy másik újabb közlemény a Science-ben 2005-ből viszont a mitokondriális kataláz overexpressziója révén bizonyítja transzgenetikus egérben az élettartam növekedését [11].

A kataláz overexpressziója bizonyosan fokozottabb védelmet nyújt az élő szervezeteknek, mint a katalázhiány. Humán vonatkozásban, annak a kérdésnek, hogy mennyi az illető kataláz aktivitása, azoknál az egyéneknél lehet jelentős, akik fokozott oxidatív stressz hatásnak vannak kitéve. Az élettartamot nagyon sok tényező befolyásolja és ezek közül az egyik lehet a kataláz aktivitás, amelynek veleszületett hiánya kisszámú adatunk alapján azonban nem csökkentette az élettartamot.

A veleszületett katalázhiányos családok tagjai élik a szokásos magyar lakosok életét, kataláz hiányra utaló jelről vagy a kataláz hiányról a vizsgálat kezdetéig nem volt tudomásuk.

Az akatalazémiás és hypokatalazémiás egyének számára ajánlható, hogy kerüljék azokat a helyzeteket, amelyek a fokozott oxidatív stressz és egyéb folyamatok révén fokozott hidrogénperoxid termeléssel járnak.

### **6. 2. 3. 5. A kataláz hiány és a diabetes mellitus [5,12,32,28]**

Az első és a második akatalazémiás nőnél a 2-es típusú diabetes az anamnézisben már szerepelt. Ez adta az indítékot, hogy ezzel a kérdéssel részletesebben foglalkozzunk, bár az irodalomban erre vonatkozó adatot nem

találtunk. Ennek magyarázata lehet, hogy Japánban a vesztes háború, a gazdasági, megélhetési viszonyok és a tradicionális japán táplálkozási viszonyok nem kedveztek a 2-es típusú diabetes kialakulásának. Svájcban a szűrés katonaköteles 18-20 éves fiatalokat érintett, akiknél még nem alakulhat ki diabetes.

Ezzel szemben a magyarországi szűrés életkortól függetlenül a régió közel minden felnőtt lakosára kiterjedt, így nagyobb lehetőség volt a kérdés átfogó vizsgálatára.

A diabetes gyakorisága a veleszületett katalázhiányban 12,1% (8/66), ez az akatalazémiában 100% (2/2), míg hypokatalazémiában 9,4% (6/64).

Ez jóval magasabb ( $p < 0,005$ ), mint a magyarországi gyakoriság. Egy budapesti felmérés szerint a diabetes gyakorisága Magyarországon 1,75% (1049/60 000) [5, 12].

A veleszületett kataláz hiányban a 2-es típus a domináló (7/8: 87,5%). A nők aránya ebben a típusban 100% (7/7), míg a magyarországi diabetes regiszterben ez jóval kevesebb, azaz 60,5%.

A diabetes felismerése a kataláz hiányosoknál átlagosan a 41,6. évben történt, míg ez az érték a hazai regiszter szerint magasabb, mint 56,3 év. Kiemelendő az a két hypokatalazémiás, akiknél már 35, illetve 36 évesen manifesztálódott a diabetes.

A diabetes fokozott gyakoriságát veleszületett katalázhiányban a következőkkel magyaráztuk. Az egész életen át tartó megnövekedett hidrogénperoxid koncentráció által okozott az oxidatív stressz révén károsíthatja az oxidációra érzékeny pancreas  $\beta$ -sejtjeit, és ennek lehet az eredménye a csökkent insulin, illetve C-peptid koncentráció [12]. Ezen Lancet-beni érvelésünket [5] erősítette meg Heales a Lancet következő számában [14] és tette hozzá, hogy az oxidatív stressz révén a mitokondriális elektrontranszport játszhat fontos szerepet ebben a patológiás folyamatban. A patomechanizmus, amely itt szerepet játszik, még nem kellően ismert, bár a hidrogénperoxid szerepét a jelátvitelben az inzulinnal kapcsolatában több közleményben is vizsgálják [15-17].

A kataláz enzim veleszületett hiánya a diabetes 2-es típusának fokozott gyakoriságát mutatta, ez különösen a nőknél volt jelentős, és a diabetes korai manifesztálódását eredményezte. A később ismertetésre kerülő mutáció analízis a diabeteses betegeknek különböző típusú (A, B, C, D) mutációkat mutatott, ami arra utal, hogy nem a mutáció típusa, hanem annak eredménye (csökkent kataláz aktivitás, megnövekedett hidrogénperoxid koncentráció) járulhat hozzá a betegség kialakulásához.

A diabetes mellitus 2-es típusának kialakulásához vezető genetikai polymorfizmusok közül legújabbban a karboxil-észter lipáz mutációjáról számoltak be. Ez a mutáció a pancreas beta-sejtek dysfunkciója révén eredményezi a fokozottabb (15-20%) diabetes mellitus fogékonyságot [18]. A

hatásmechanizmus azonban itt még a kataláznál is kevésbé ismert és nélkülözi a további bizonyítást.

A diabetes mellitus manifesztálódása genetikai (több gén mutációja) és a környezeti faktoroknak az eredője, amelyek közül az egyik minor faktor lehet a katalázhiány is. Az egyéb faktorok szerepét mutatja, hogy nem mindegyik hypokatalazémiásnál alakult ki a diabetes mellitus.

### **6. 3. 3. Az örklődő kataláz hiány biokémiai jellemzői**

#### **6. 3. 3. 1. A hidrogénperoxid metabolizmus további enzimeit [5,32]**

A veleszületett kataláz hiány a szervezet megnövekedett hidrogénperoxid koncentrációját eredményezi. A hidrogénperoxid metabolizmus két további enzimének a hidrogénperoxidot produkáló szuperoxid dizmutáz és a szintén hidrogénperoxidot fogyasztó glutationperoxidáz aktivitása fontos lehet ezeknél az egyéneknél.

A veleszületett katalázhiányos egyéneknél a szuperoxid dizmutáz aktivitás szignifikánsan ( $p < 0,001$ ) emelkedett (katalázhiányos:  $1683 \pm 359$  U/gHb vs normokatalazémiás:  $1094 \pm 276$  U/gHb, n: 16).

Ezt kedvezőtlen jelnek tekintettük, mivel a megnövekedett szuperoxid dizmutáz révén a szuperoxid anionból egységnyi idő alatt mintegy másfélszeres mennyiségű hidrogénperoxid keletkezhet, aminek eliminálására csak az  $\approx 50\%$ -ra csökkent kataláz aktivitás áll rendelkezésre.

A glutationperoxidáz, amely aktivitásának jelentős növekedést vártunk volna a hidrogénperoxid detoxifikálására, mindössze mintegy  $10\%$ -os, nem szignifikáns ( $p > 0,05$ ) növekedést mutatott (katalázhiányos:  $45,0 \pm 17,0$  U/gHb vs normokatalazémiás  $40,7 \pm 18,8$  U/gHb, n:16).

A fenti két enzim aktivitásának változása a veleszületett katalázhiányosoknál (1 akatalazémiás, 15 hypokatalazémiás) nem kedvező irányú a szuperoxid dizmutáz esetén, és talán még a nagyobb oxidatív stressz kockázatát növeli, amit a glutationperoxidáz nem szignifikáns növekedése nem tud kompenzálni.

#### **6. 3. 3. 2. A szénhidrát és lipid metabolizmus paraméterei [19,37]**

A vizsgálat során 1 akatalazémiás, 27 hypokatalazémiás (nem diabeteses) és 28 nemben, korban hasonló (match-paired) normokatalazémiás családtag laboratóriumi paramétereit hasonlítottuk össze.

A szénhidrát metabolizmus három (éhgymri glükóz, hemoglobin  $A_{1c}$ , fruktózamin) paraméterei a hypokatalazémiásoknál kedvezőtlenebb, a diabetes felé mutató értékeket tartalmaznak, azonban a  $6\%$ -ot meg nem haladó növekedések nem szignifikánsak ( $p > 0,193$ ).



A hypokatalazémiás egyének összkoleszterin, LDL-koleszterin, Lp(a), Apo B koncentrációi és az LDL oxidációval szembeni stabilitása a nem kívánt irányban szignifikánsan megváltozott. Az Apo A1 koncentráció szignifikáns növekedése talán kisebb mértékű védelemre utalhat.

Az atherosclerosis laboratóriumi paramétereinek változását elsőként detektáltuk veleszületett katalázhiányban. Feltehetően ezek eredménye is az exitált katalázhiányos betegeknél tapasztalt, a korukhoz képest fokozottan atherosclerotikus erek. Ez feltehetően az egész életen át tartó katalázhiány miatti nagyobb hidrogénperoxid koncentráció eredménye. Az a feltehetően oxidációs mechanizmus, amely révén a hidrogénperoxid befolyásolta a lipid metabolizmust nem ismert és további vizsgálatokat igényel.

### **6. 3. 3. 3. A lipid peroxidáció és a karbonil képződés**

A hidrogénperoxid további oxidációs hatásának vizsgálatára mértük a plazma lipidperoxidációt és a fehérje karbonil (csoport) koncentrációt.

Az eredmények azt mutatják, hogy a vér kataláz aktivitással fordítottan arányos a lipidperoxidáció, azaz a hypokatalazémiásoknál magasabb, mint a normokatalazémiás családtagoknál (hypokatalazémiás:  $2,44 \pm 1,07$  MDA/ gHb vs  $1,38 \pm 1,07$ , n: 15,  $p=0,0065$ ).

Ez arra enged következtetni, hogy a hypokatalazémiások a fokozott hidrogénperoxid stressz révén már kisebb kapacitással rendelkeznek, mint az ilyen hatáshoz nem szokott normokatalazémiás családtagok.

A fehérje karbonil koncentráció a vér kataláz aktivitással nem mutatott összefüggést. A 34 hypokatalazémiás és 32 normokatalazémiás átlagos karbonil koncentrációja ( $1,16 \pm 0,34$ ), mintegy 10,5%-al magasabb, mint a 32 normokatalazémiásé ( $1,05 \pm 0,26$ ), de ez az emelkedés nem szignifikáns ( $p=0,159$ ).

### **6. 3. 3. 4. A kataláz protein és szöveti kataláz aktivitás [20,36]**

A kataláz protein elektroforetikus mobilitását és izoelektromos pontját vizsgáltuk a katalázhiányos egyének családjában és a következőket találtuk.

Az elektroforetikus mobilitásban nincs szignifikáns különbség a katalázhiányos ( $29,81 \pm 0,26$  mm, n: 6) normokatalazémiás családtagok ( $29,9 \pm 0,14$  mm, n: 4  $p: 0,584$ ) és a kontroll egyének ( $30,0 \pm 0,2$  mm, n: 10,  $p: 0,394$ ) között.

Hasonlóan alakult az izoelektromos pontok közötti nem szignifikáns ( $6,02 \pm 0,1$ , n:6 vs  $6,00 \pm 0,02$ , n:4, vs  $6,01 \pm 0,02$  mm, n:10,  $p>0,26$ ) különbség.

Ezek alapján állítható, hogy a magyarországi akatalazémiában a kataláz fehérje ezen vizsgálatok alapján megkülönböztethetetlen a referens egyének katalázától, hasonlóan a Japán, de eltérően a Svájci típusú akatalazémiától.

Az egyes szövetekben a kataláz aktivitás a kontrollokhöz viszonyítva 12,4% (pancreas) és 15,3% (lép) között változott, ami hasonló a Japánban detektálthoz, de alacsonyabb, mint a Svájci akatalazémiában (39-50%).

A legalacsonyabbnak a vér kataláz aktivitás ( $\approx 5\%$ ) bizonyult, hasonlóan a Japán és a Svájci akatalazémiához.

### **6. 3. 3. 5. A kataláz hiány és krónikus hemolízis [21,35]**

A veleszületett katalázhiány révén megnövekedett hidrogénperoxid koncentráció okozhatja-e a vörösvértestek krónikus hemolízisét? E a kérdés megválaszolására vizsgáltuk a hemolízis vér (hemoglobin, vörösvértestszám), és szérum (kataláz, hemoglobin, haptoglobin, LDH, LDH izoenzimek) paramétereit 2 akatalazémiás, 8 hypokatalazémiás egyénnél.

A hemolízis vér és szérum paramétereit közül hemoglobin (vér és szérum) kivételével nem találtunk szignifikáns ( $p < 0,005$ ) eltérést a katalázhiányos egyéneknél.

Az a következtetésünk, hogy a veleszületett katalázhiány nem okoz krónikus hemolízist.

A csökkent hemoglobin koncentrációnak nem a hemolízis lehet az okozója, mint ezt a következő részben szélesebbkörűen vizsgáljuk és magyarázzuk [22].

A két akatalazémiásnál a fenti változások még szembetűnőbbek, de kis vizsgálatszám miatt statisztikai értékelés nem történt.

A hidrogénperoxid eliminálásában kisebb szerepet játszó glutationperoxidáz mintegy 1,5%-os nem szignifikáns változást mutatott ennél a 8 katalázhiányos egyénnél. Később a nagyobb számú vizsgálat [5] mintegy 10%-os, ugyancsak nem szignifikáns emelkedést mutatott, míg a két akatalazémiásnál pedig csökkenés volt kimutatható.

### **6. 3. 3. 6. A kataláz hiány és a homocisztein-, vörösvértest metabolizmus [22,33]**

Irodalmi adatok [23, 24], mutatják hogy a magas homocisztein koncentráció a jelentős mennyiségű hidrogénperoxid generálásával oxidatív stresszt okozhat, aminek hatása a katalázhiányos egyéneknél még fokozottabb. Ezért vizsgáltuk a katalázhiányos egyéneknél (külön a nők és a férfiak) a homocisztein koncentrációt, illetve a B<sub>12</sub>, folsav, vér hemoglobin, MCV, szérum LDH, LDH izoenzimek, szérum haptoglobin koncentrációkat.

Szignifikáns eltérést kaptunk a folsav, homocisztein, vér hemoglobin és MCV (vörösvértest Mean Cell Volume) értékeknél mindkét nem esetén.

Ezen vizsgálati eredményeink megerősítik az előző, kevesebb katalázhiányosnál detektált, korábbi (1995) eredményeinket [21]. A jelen [22] (2003) vizsgálatoknál az összehasonlítás a katalázhiányos családokon belül történt, vagyis a kataláz hiányosok vizsgálati eredményeit a családok normokatalazémiás

tagjaiéhoz viszonyítottuk. Az ilyen típusú értékelés objektívabb, mint az előző, amikor a referens vagy kontroll csoport volt a viszonyítási alap.

Az egzaktabb értékelés nagyobb mintaszámmal megerősítette, hogy a krónikus hemolízis a kataláz hiányos egyéneknél nem volt detektálható egy későbbi időpontban sem.

A korábban tapasztalt kismérvű anemiáról és a szignifikánsan ( $p: 0,001$ ) megnövekedett MCV-ről most már látható, hogy a csökkent folsav,  $B_{12}$  miatti csökkent vérképzés eredményezte.

Az irodalmi adatok [23, 24] alapján feltételezhető, hogy a megnövekedett homocisztein koncentráció révén produkált hidrogénperoxid növekedést a csökkent kataláz nem tudja metabolizálni. Ez a megnövekedett hidrogénperoxid okozhatja az oxidációra rendkívül érzékeny folsav koncentrációjának csökkenését, ami a kismérvű anemiában és a megnövekedett MCV-ben manifesztálódott.

A folsav bevitel, amely hasonlóan történt, mint a  $B_{12}$ -é, nem volt csökkent, mint ezt a  $B_{12}$  vitamin koncentrációk mutatják.

A férfiak illetve a nők esetén hasonlóak voltak az eltérések, de az abszolút értékek (hypo és normokatalazémiások) kissé különböztek. Ez is indokolta, hogy a nemek szerinti megoszlásban történjen a vizsgálati eredmények értékelése.

### **6. 3. 3. 7. A kataláz hiány és a HLA-DRB allél típusok [25,34]**

A Human Major Histocompatibility Complex (MHC) molekuláinak feladata az antigén felismerés. A HLA-DRB allélok ismerete fontos a transzplantációknál és a fogékonysági allélként bizonyos betegségekben (autoimmun, bizonyos tumorok, diabetes) azok patomechanizmusának felderítésében.

Az 1997-ban újnak számító gyári AMPLICOR kittel vizsgáltuk a HLA-DRB allélok megoszlását 16 hypokatalazémiás (vér kataláz  $51,5 \pm 17,8$  MU/l) és 24 normokatalazémiás ( $108,6 \pm 13,6$  MU/l) egyéneknél. A vizsgálatokkal arra a kérdésre kerestük a választ, hogy a veleszületett katalázhiányos egyének rendelkeznek-e további fogékonysági allélokkal.

A kisszámú mintát tartalmazó vizsgálat statisztikai analízise nem mutatott szignifikáns ( $p > 0,2$ ) eltérést az allél, allélcsoportok megoszlásban a hypokatalazémiások és a kontrollok között. Ezek alapján arra következtethetünk, hogy a veleszületett katalázhiányos egyének esetén a HLA DRB egyes betegségek fogékonysági alléljai, nem társulnak a kataláz hiányhoz.

A vizsgálatok értékét csökkenti, hogy csak egy esetben, a DRB0701 allélnál utalnak egy konkrét allélra, míg a többi esetben az allélok egy csoportját adják meg.

Az új módszer bemutatása, illetve alkalmazása volt a közlemény elsődleges célja, és a hasonló elven (oligonukleotid hibridizáció, látható fénytartományában történő detektálás tesztcsíkon kivitelezve) működő tesztek azóta elterjedten alkalmazzák a klinikai laboratóriumi gyakorlatban.

### 6. 3. 3. 8. A klinikai és biokémiai eltérések összefoglalása magyarországi akatalazémiában

#### Klinikai szempontok veleszületett katalázhiányban

|                              |  |
|------------------------------|--|
| Nemek aránya                 | Nő>Férfi   |
| Lokalizáció                  | az ország különböző régióiban  |
| Gyakoriság                   | kisebb, mint Japánban, közel azonos, mint Svájcban                   |
| Átlagos életkor              | nem változott  |
| Exitáltak esetén             | fokozott arteriosclerosis, fokozott a tumor                          |
| Takahara tünet               | nem detektálható   |
| Diabetes mellitus            | fokozott előfordulás, különösen a 2-es típusé, korábbi manifesztáció |
| HLA-DRB fogékonysági allélok | nem változtak  |

#### Klinikai kémiai/biokémiai szempontok katalázhiányban

|                          |   |
|--------------------------|---|
| Szuperoxid dizmutáz      | emelkedett  |
| Glutathion peroxidáz     | nem szignifikáns emelkedés  |
| Szénhidrát metabolizmus  | nem szignifikáns emelkedés: glükóz, fruktózamin, hemoglobinA <sub>1C</sub>                                      |
| Lipoprotein metabolizmus | szignifikáns változás: triglicerid, össz-LDL-, HDL-, koleszterin, Lp(a), ApoB, ApoA1, LDL oxidatív rezisztencia |
| Lipidperoxidáció         | fokozott  |
| Karbonil kataláz protein | nem szignifikáns növekedés  |
| Krónikus hemolízis       | nem detektálható  |
| Homocisztein             | növekedett  |
| Fólsav                   | csökkent  |
| B12                      | nem változott   |
| Vérképzés                | kismérvű macrocyter anemia, hemoglobin csökkent, MCV növekedett   |
| Szöveti kataláz          | hasonlóan alacsony, mint a Japán típusnál, alacsonyabb a Svájcinnál   |

Adatok hiányában ezen paraméterek a korábbról ismert Japán és Svájci típusal csak néhány esetben (gyakoriság, nemek aránya, kataláz protein mobilitása) vehetők össze, míg a többi paraméter esetén ezek új megfigyelésnek tekinthetők.

A veleszületett katalázhiányt, az akatalazémiát korábban [26, 27], de még Eaton és Ma által készített és 1995-ben megjelent legutolsó összefoglaló könyvfejezetben [28] is minden tünet nélküli, egyszerű enzimhiánynak tartották. Kobayashi és mtsai [28] 2005-ben a jelenséget akatalazémiás egereken vizsgálva a vese fokozott oxidatív károsodását (fibrosis) észlelték. Közleményükben

kiemelték, hogy humán vonatkozásban csak az általunk közölt diabetes és lipid eltérések ismertek.

Az általam detektált klinikai és biokémiai elváltozások ugyan nem a katalázhiány specifikus jellemzői, de demonstrálják, hogy a veleszületett katalázhiány több patológiás eltérésért lehet a felelős.

Ezen adatok ismeretében a magyarországi akatalazémia egy új szindrómának tűnik, aminek klinikai, biokémiai eltérései kimutathatók és amelyekhez még a genetikai eltérések is csatlakoznak.

#### **6. 3. 4. Az örklődő kataláz hiány genetikai jellemzői**

##### **6. 3. 4. 1. A molekuláris genetikai vizsgálati stratégia [30-34,38,40,39]**

A veleszületett katalázhiány magyarországi detektálása, klinikai és klinikai kémiai jellemzése után megkezdtem a katalázhiányért felelős mutáció(k) keresését.

Ehhez a munkához felhasználtam a Stanfordi Egyetem Patológiai Intézetében (Laboratory of Experimental Oncology, Department of Pathology, School of Medicine, Stanford University, Stanford, CA, USA) Fulbright kutatói ösztöndíjasként elsajátított, az 1992-ben újnak minősülő molekuláris genetikai vizsgálatokat, amelyeket itthon bevezettem.

Ezek a következők: genomiális DNS extrahálás anioncserés eljárással, nem radioaktív DNS detektálás [30], az akatalazémia vizsgálatához szükséges kataláz próba készítése [31], és a polimeráz láncreakció termékeinek új módszerekkel (repeat-, RFLP-, SSCP-heteroduplex analízis) történő mutáció szűrési/kimutatási módszerei [32-34].

Ezek a módszerek és továbbfejlesztett változataik, ma már széleskörűen használatosak a rutin klinikai laboratóriumi munkában.

##### **6. 3. 4. 2. A Japán és a Magyar akatalazémia molekuláris genetikai összehasonlítása [35,36,4142]**

A mutáció szűrési stratégiát először az ismert Japán A és B típus mutációinak kimutatására alkalmaztam a magyarországi kataláz hiányos egyéneknél.

A kataláz gén 4.exonjának/intronjának PCR-SSCP, PCR-RFLP, PCR-heteroduplex és a nukleotid szekvencia analízis azt mutatta, hogy sem a Japán A típus mutációja (G5A splicing mutáció a 4. intronban), sem a Japán B típus mutációja (Tdel10, a 4. exonban) nem mutathatók ki a magyarországi akatalazémiás családokban.

Az akatalazémia Svájci típusának pontos mutációja nem ismert, így azt DNS szinten nem tudtuk vizsgálni, de az elektroforetikus vizsgálatok korábban igazolták, hogy eltérő a Magyarországon detektált akatalazémiától.

Ezen vizsgálati eredmények alapján arra következtettem, hogy a magyarországi akatalazémia, amely eltér a Japánban és Svájcban találtaktól, az enzimhiány egy új genetikai formája, amelyért felelős mutáció még felderítésre vár.

#### **6. 3. 4. 3. Benignus kataláz polimorfizmusok Magyarországon [37-40,43,44,45,46]**

A veleszületett kataláz hiányért felelős mutációk vizsgálata során a következő polimorfizmusokat találtuk, amelyek nem járnak kataláz aktivitás csökkenéssel.

A kataláz gén 5' végének analízise Hinf I RFLP módszerrel a régió nagyfokú polimorfizmusát mutatta. A 9 különböző DNS fragmentből 8 mintázat alakult ki, de ezek közül egyik sem volt jellemző a hypo- vagy akatalazémiára [37].

A további polimorfizmusokat [38, 39] amelyeket detektáltunk, a kövér betűvel jelzett polimorfizmusokról először mi számoltunk be.

5' régió: A-21T, **C-20A**, **C-18T**, **T4C**, **T44C**, **T49C**, exon 1: **C12T**, **C27A**,  
intron 1: **G60A**, **G61T**, intron 2: **G7A**, **T11A**, intron 12: **G31T**.

Az 5' régióban talált polimorfizmusok megoszlása katalázhiányosoknál (Akatalazémia, hypokatalazémia) és kontrolloknál azt mutatják, hogy az egyes allélok változó gyakorisággal fordulnak elő mindhárom csoportban.

Három olyan mutáció van (-21, -20, 4 nukleotid pozíció), amelyben az akatalazémiás mutáció 100%-os (-21) vagy 0%-os (-20, 4) gyakoriságú, amelyek közül az első érdemel részletesebb magyarázatot.

A -21-es pozícióban az akatalazémiásoknál csak a mutáns T található, a hypokatalazémiásoknál ennek gyakorisága mintegy 95%, azonban a normokatalazémiásoknál is több, mint 50%.

Ezek alapján arra következtethetünk, hogy ebben a nukleotid pozícióban Magyarországon a vad típusnál van T és a mutánsnál az A nukleotid.

Az ismert kataláz enzim polimorfizmusokat egy Review-ban foglaltam össze [40].

#### **6. 3. 4. 4. A magyarországi akatalazémia genetikai típusai**

A Magyarországon detektált akatalazémia genetikailag különbözik a más országokban detektált mutációktól.

A különböző mutációkat az abc kezdő nagybetűivel jelöltem.

##### **6. 3. 4. 4.1. A magyarországi akatalazémia A típusa [41,42,47,48]**

A mutáció szűrési eljárások közül a heteroduplex analízis az akatalazémiás család tagjai 2. exonjának vizsgálatakor különösen szépen detektálható irodalmi

ritkaságú, heteroduplex képződést mutatott [41]. A heteroduplex képződés a család összes hypokatalazémiás tagjánál megfigyelhető volt, míg a normokatalazémiások közül egyiknél sem.

A nukleotid szekvencia analízis azt mutatta, hogy a 2.exon 138-as nukleotid helyén egy GA beépülés detektálható, amely a GA ismétlődések számát 4-ről 5-re növelte meg, frameshift (vázeltolódás)-et és megváltozott aminosav sorrendet eredményezett a 69.aminosavtól a 133.aminosavig, ahol TGA stop kodon generálódott.

A 399-401 nukleotid helyeken generálódott egy TGA stop kodon, amelynek eredménye a 133 aminosavból álló trunkált protein.

Ez a trunkált protein nem tudja ellátni az 527 aminosavból álló kataláz alegység enzimátikus funkcióját és felelős az enzim aktivitás hiányáért.

A PCR-heteroduplex mutáció szűrés a kataláz gén 2.exonjában a GA beépülés révén olyan hatékony, hogy ennek az egyszerű módszernek az alkalmazásával további 3 hypokatalazémiás családban sikerült azonosítani ezt a mutációt [42].

Ez a mutáció kimutatható volt az akatalazémiás család két akatalazémiás (4,5 MU/l és 7,6 MU/l, homozigóta mutáns), 6 hypokatalazémiás tagjánál, valamint további három hypokatalazémiás család 23 tagjánál (vér kataláz: 45,8%, heterozigóta mutáns), míg a 26 normokatalazémiás családtagnál (vér kataláz: 100%,) ez a mutáció vad típusúnak bizonyult.

A PCR-heteroduplex mutáció szűrési módszert sikerrel alkalmazták diabeteses betegeknél újabb kataláz mutáció kimutatására [54].

#### **6. 3. 4. 4. 2. A magyarországi akatalazémia B típusa [43,49]**

A 2.exon vizsgálatok a PCR-heteroduplex analízis polimorfizmust mutatott az egyik hypokatalazémiás családnál. A nukleotid analízis a 2.exon 79-es nukleotid pozíciójába egy G nukleotid beékelődést mutatott.

Ennek eredménye a vázeltolódás a 49.aminosavtól az 57.aminosavig, a 171-173 nukleotid pozíciókban a terminációs TGA terminációs kodon generálódása, és ezáltal az 527 aminosavból álló kataláz alegység helyett egy 57 aminosavból álló trunkált protein képződik.

Ez a mutáció 1 hypokatalazémiás család 3 hypokatalazémiás (heterozigóta) tagjánál eredményezi a csökkent kataláz aktivitást 68,1±5,9 MU/l, 52,2%. A 4 normokatalazémiás (vad típus) családtagnál (130,4±8,7 /MU/l, 100%) az enzim aktivitás nem változott.

#### **6. 3. 4. 4. 3. A magyarországi akatalazémia C típusa [44,50]**

A PCR-SSCP mutáció szűrési eljárás polimorfizmust mutatott két család hypokatalazémiás tagjainál és a nukleotid szekvencia analízis a 7. intron 5. pozíciójában a G (vad) nukleotid mellett T (mutáns) nukleotidot is mutatott.

Az exon-intron határ közelében lévő mutációról Western blot analízissel igazoltuk, hogy splicing (kivágási) típusú mutáció, amit a hypokatalazémiásoknál detektált enzim aktivitás csökkenésen (7 hypokatalazémiás vér kataláz:  $58,5 \pm 11,5$  MU/l, 60,6%) túlmenően a kataláz fehérje csökkenés is igazolt.

A két család normokatalazémiás tagjainál (vad típus) nem változott a kataláz aktivitás ( $96,9 \pm 4,1$  MU/l, 100%).

A mutáció következtében kialakulható trunkált proteinben az aminosav változás érinti az alegységek közötti kötődést, a hem környezetében található essenciális (Tyr360, His361, Tyr357, Arg353) és a fő (hidrofób) csatorna kialakításában résztvevő fontos (Glu460, Phe461, His465, Lys467, Asn500) aminosavakat [45-48].

#### **6. 3. 4. 4. 4. A magyarországi akatalazémia D típusa [49,51]**

A PCR-SSCP mutáció szűrési eljárás a 9.exon vizsgálatokor polimorfizmust mutatott egy hypokatalazémiás család 4 hypokatalazémiás tagjánál.

A nukleotid szekvencia analízis a 9. exon 5.helyén G (vad) és T (mutáns) nukleotidokat mutatott. Ez a missense mutáció a 353(354) Arginint Ciszteinné változtatta, aminek hatása az enzim aktivitására a következők alapján magyarázható [46-48].

A 320-246 pozíciójú aminosavak az egyes alegységek közti kapcsolatot biztosítják. Ezen aminosavak közül néhánynak az essenciális Tyr357, Arg353-nak, további jelentősége is van, mivel a fő csatorna alján található hemhez közeli a pozíciójuk.

Az Arginin 353 guanidin csoportja mindössze  $3,5 \text{ \AA}$  távolságra van a hem vasát pozicionáló Tyr 357 fenolos oxigénjétől, és így segítheti a Tyr OH csoportjának az ionizációját. Az Arginin 353 feltehetően a His 217-el létesített H-híd kötés révén a katalitikus folyamatban is szerepet játszik.

A redox reakcióban a töltésátadásban is fontos szerepet játszik az Arg 353, a His 217, az Asp 348-al együtt.

A mutáció révén történő aminosav változás (Arg353Cys) lehet felelős egy hypokatalazémiás család 4 hypokatalazémiás tagjánál mért csökkent ( $55,6 \pm 16,9$  MU/l, 53,7%, GT: heterozigóta mutáns) vér kataláz aktivitásért. A 6 normokatalazémiás ( $103,6 \pm 23,5$  MU/l, 100%) családtag vad típusnak (GG) bizonyult.

#### **6. 3. 4. 4. 5. A magyarországi akatalazémia E típusa**

Vitiligos betegek vér kataláz aktivásának vizsgálatokor csökkent kataláz aktivitáskor genetikai vizsgálatot is közbeiktattunk.



A 9-es exon (magyarországi D típus) vizsgálatokor a PCR-heteroduplex és PCR-SSCP mutáció szűrési eljárások a D-típustól eltérő polimorfizmust mutattak egy vitiligos betegnél, és ezután a vizsgálatba bevontuk a kisszámú, élő családtagokat.

A nukleotid szekvencia analízis a 9.exon 37. pozíciójában C (vad) és T (mutáns) nukleotidokat mutatott. Ez a missense nukleotid csere a következménye az Arginin 365(364) Cisztein csere.

Az Arginin 365, az Arginin 72 az Arg 112-vel együtt a hem környezet esszenciális aminosavai közé tartozik, mivel a Tyr 358 karboxil csoportja töltésének semlegesítésével, és a hem propion csoportjával alkotott H-híd kötés révén a hem vasának reakcióképességét tudja befolyásolni.

Ezen fontos aminosav megváltozása elfogadhatóan magyarázza az enzim aktivitás csökkenését ( $66,9 \pm 7,1$  MU/l, 61,6%) egy hypokatalazémiás család két heterozigóta (CT) tagjánál. A vad típusnál (CC) a vér kataláz aktivitás  $108,5 \pm 2,6$  MU/l (n: 2, 100%), és a mutáció nem volt kimutatható.

Ez a mutáció Kelet-Magyarországi régióban került felfedezésre, vagyis a veleszületett katalázhiány nem korlátozódik a Balaton felvidékre, bár az ott detektált egyik hypokatalazémiás család is Pécskáról (Erdély, Románia) került a Dunántúlra.

#### 6. 3. 4. 4. 6. A veleszületett katalázhiányért felelős gén mutációk összefoglalása

A következő táblázatban foglaltam össze az eddig ismert azon mutációkat, amelyek a veleszületett kataláz hiány feltételezett okozói lehetnek.

A veleszületett katalázhiányért felelős mutációk

| Név      | Mutáció |               | Kataláz   |          | n          | Leírása |                      |
|----------|---------|---------------|-----------|----------|------------|---------|----------------------|
| Ország   | Típus   | Forma         | Helye     | Típusa   | A/<br>Hypo | Idő     | Szerző/Hivatkozás    |
| Japán    | A       | 4GA           | 4. intron | splicing | <1%        | 6       | 1990 Wen JK, 50      |
| Japán    | B       | Tdel10        | 4. exon   | deléció  | <1%, <50%  | 5       | 1995 Hirono A, 51    |
| Kanada   | -       | G113A         | 9. exon   | missense | 55,4%      | 4       | 1995 Parboosingh, 52 |
| Ausztria | -       | C96T          | 3. exon   | missense | nincs      | 1       | 2004 Wally V, 53     |
| Magyar   | A       | 138 GA insert | 2. exon   | nonsense | 5,4%/45,8% | 31      | 2000 Góth L, 41      |
| Magyar   | B       | 9 G insert    | 2. exon   | nonsense | 52,2%      | 3       | 2001 Góth L, 43      |
| Magyar   | C       | G5T           | 7. intron | splicing | 60,6%      | 7       | 2001 Góth L, 44      |
| Magyar   | D       | G5T           | 9. exon   | missense | 53,7%      | 4       | 2005 Góth L, 49      |
| Magyar   | E       | C37T          | 9. exon   | missense | 61,6%      | 2       | 2005 Góth L          |
| Magyar   | F1      | T96A          | 2. exon   | missense | 53,2%      | 1       | 2005 Vitai M, 54     |
| Magyar   | F2      | G135T         | 2. exon   | missense | 51,9%      | 1       | 2005 Vitai M, 55     |

A mutációk egy része azonban csak egyetlen esetre korlátozódik [55, 53], és ezek családi előfordulásáról nincs adatunk [54].

Egyes esetekben a mutáció eredményeként kialakult katalázhiányról sem közöltek a szerzők adatokat.

Az akatalazémia genetikai vizsgálata is alátámasztja, bár lényegesen kisebb mértékben, a veleszületett katalázhiány világméretű elterjedését és heterogenitását.

A legtöbb kataláz mutációt (7/11, 63,6%) Magyarországon detektálták. Az akatalazémiás és 13 hypokatalazémiás család közül az akatalazémiás és 8 hypokatalazémiás családnál ismert a kataláz gén mutációja, de a további 5 családnál még vizsgálatra vár.

A magyarországi A, B, C, D, E típusok azt mutatják, hogy Magyarországon is genetikailag heterogén az akatalazémia. A további heterogenitást mutatja, hogy a magyarországi típusok eltérnek a más országokban detektáltaktól.

A klinikai, klinikai kémia elváltozásokon túlmenően a genetikai jellemzés magyarországi bemutatása tovább erősíti azt, hogy ez a tünetegyüttes kielégítheti a szindróma elnevezés iránt támasztott követelményeket.

#### **6. 3. 4. 4. 7. Az akatalazémia értékelése**

Az akatalazémia tünetei korábban nem voltak ismertek, ezért csak tünetmentes enzimhiánynak tartották [28].

A veleszületett katalázhiány következtében kialakuló komplikációk a szindróma tünetmentessége és ritkasága miatt, csak véletlenszerűen voltak észlelhetők és összegyűjthetők.

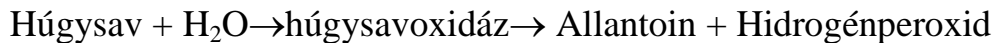
Az állatkísérletek például az akatalazémiás egereken történő vizsgálatok eredményei csak fenntartásokkal fogadhatók humán vonatkozásban, mivel a humán akatalazémiában a szöveti kataláz aktivitások jóval magasabbak, mint a radiológiai kezeléssel vagy kataláz gén knock outtal kialakított akatalazémiás egereknél [29].

A katalázhiányról rendelkezésre álló ismereteink a saját eredményeim és az ezekhez csatlakozó újabb irodalmi adatok alapján bővültek, illetve megváltoztak, mint ezt a következő tanulságos irodalmi példák mutatják.

#### **‘Tumor lysis’ szindróma, urikáz és a kataláz**

A tumor lysis szindróma [32] akkor alakul ki, amikor a tumoros betegeknél a kemoterápia vagy besugárzás során kialakuló sejtlýsis termékei a keringésbe kerülnek. Ezek közül a hyperuricemia, hyperkalemia és hyperphosphatasemia a leggyakoribb. A nagy koncentrációjú és rosszul oldódó húgysav obstruktív uropatia előidézője lehet.

A szérumban húgysav koncentrációjának csökkentésére alkalmazzák az allopurinol terápia, amely csökkenti a húgysav szintézist, valamint a húgysav oxidáz infúziót, amely sikeresen csökkenti a szérumban húgysav koncentrációt a következő reakció alapján



Az allantoin jól oldódik és a vesén át eliminálódik, míg a kataláz a hidrogénperoxidot eliminálja.

Ha feltételezzük, hogy a kiindulási húgysav koncentráció 300  $\mu\text{mol/l}$  és a terápia során ezt nagyon rövid idő alatt (percek) a húgysavoxidáz hidrogénperoxiddá konvertálja, akkor a plazmában a hidrogénperoxid koncentráció akár 300  $\mu\text{mol/l}$  is lehet. Ez mintegy 100-szorosa a plazma (0,8-6,7  $\mu\text{mol/l}$ ) steady state hidrogénperoxid koncentrációjának. Ennek eliminálására a szérumban kataláz aktivitása már nem elégséges, de rendelkezésre állhat a vörösvértestek nagy kataláz aktivitása.

A veleszületett katalázhiányos egyéneknél azonban ez homozigótáknál 0-5%, a heterozigótáknál, súlyos anémiákban mintegy 50%. Ezekben az esetekben nem látszik biztosítottnak a hidrogénperoxid shock elleni védelem.

A terápia során már beszámoltak káros következményként methemoglobinemiáról, ami glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz hiánynak tulajdonították, míg egy másik betegnél a kialakult hemolitikus anémia kiváltó oka nem ismert [54]. Újabb közlemények egy további hemolízisről és szérumban LDH aktivitás növekedéséről számolnak be [55-57].

Ezek alapján célszerűnek tűnhet, hogy az urikáz terápia előtti a kötelező glükóz-6-foszfát dehidrogenáz meghatározás mellett a vér kataláz aktivitás is meghatározásra kerüljön, ezáltal csökkentve a terápia kockázatát.

A Web of Science 'tumor lysis syndrome and catalase' című keresésre 1990-től-2005. 10.-ig egyetlen közleményt sem talált.

#### A hidrogénperoxiddal történő műtéti fertőtlenítés

Japán szerzők [59] 2004-ben a következő esetről számoltak be, amely egy tokiói kórházban történt. Egy 71 éves férfi beteget operáltak laryngenalis tumor miatt, és a szokásos módon a szájjüregét 300 ml 1:2 arányban hígított 3%-os hidrogénperoxiddal fertőtlenítették. Az anesztézia során észlelték, hogy a beteg methemoglobin koncentrációja 11%-ra emelkedett, ami aszkorbinsav adására 7,5%-ra csökkent és három nap múlva normalizálódott (0,5%). A később elvégzett vér kataláz mérés mintegy 1%-nyi kataláz aktivitást mutatott. A család vizsgálatakor az anya és három gyermek hypokatalazémiásnak bizonyult. Az apa, aki az anya unokatestvére volt, már korábban meghalt.

Ez talán az egyik első eset, ahol a veleszületett, tünetmentes katalázhiány súlyos elváltozást (methemoglobin képződést) eredményezett, amikor a beteg fokozott hidrogénperoxid hatás érte.

Hasonló módon a hidrogénperoxiddal történő fertőtlenítés során az oxigén fejlődés elmaradása, és a vér barnás-feketére történő színeződése indukálta az első katalázhiány felfedezését Japánban [60, 61], és Ausztriában [62].

#### Az aszkorbinsav, mint pro-gyógyszer

Chen és mtsai [63] 2005-ben számoltak be arról, hogy a terápiás koncentrációjú (6 mmol/l) aszkorbinsav a humán lymphoma sejtek szeletív pyknosis/necrosis-át okozta. A hatás eléréséhez 0,5-10% szérumból kivántatott meg, és a folyamat során kimutatták aszkorbát gyök és hidrogénperoxid képződését, amelyek felelősek lehetnek a sejtkárosításért.

Ha feltételezzük, hogy ekvimoláris koncentrációban képződik a 6 mmol/l koncentrációjú aszkorbinsavból hidrogénperoxid, akkor ez ennek 6 mmol/l koncentrációját eredményezi, ami mintegy 1000-szerese a szérumban steady state koncentrációjának. Ezt a szérumban kataláza nem, de a normokatalazémiás egyének vörösvértest kataláza metabolizálni képes. Ekkor a terápiás hatás kétségbe vonható. A veleszületett katalázhiányosoknál, különösen a homozigótáknál, viszont persistálhat a nagy hidrogénperoxid koncentráció és kifejtheti sejtkárosító hatását, amely lehet jótékony a tumorsejtek esetén vagy káros a nem tumoros sejteknél.

#### Biokémia, klinikai elváltozások és mutáció típusok

A magyarországi akatalazémia vizsgálatakor a diabetes, lipid anyagcsere, folsav, anemia vizsgálatakor a genetikai típustól független volt ezen paraméterek megváltozása. Ez arra enged következtetni, hogy nem a kataláz gén mutációs típusa, hanem annak következménye a csökkent kataláz aktivitás révén megnőtt hidrogénperoxid koncentráció lehet a felelős ezen elváltozásokért.

### Ajánlás

**1.A veleszületett kataláz hiányos egyének kerüljék a fokozott hidrogénperoxid képződéssel járó eseményeket.**

**2.A fokozott hidrogénperoxid képződéssel járó beavatkozások előtt célszerű a vér kataláz aktivitás meghatározása.**

#### Irodalom

1. Góth L. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clinica Chimica Acta* 1991; 196: 143-152. [22]
2. Vitai M, Góth L. Reference ranges of normal blood catalase activity and levels in familial hypocatalasemia in Hungary. *Clinica Chimica Acta* 1997; 261: 35-42. [25]

3. Góth L. Öröklődő kataláz-enzimhiányos állapotok Magyarországon. Orvosi Hetilap 2000: 141:445-447. [\[30\]](#)
4. Góth L. Two cases of acatalasemia in Hungary. Clinica Chimica Acta 1992; 207: 155-158. [\[29\]](#)
5. Góth L, Eaton JW. Hereditary catalase deficiencies and increased risk of diabetes. Lancet 2000; 356: 1820-1821. [\[32\]](#)
6. Góth L. A new type of inherited catalase deficiencies: Its characterization and comparison to the Japanese and Swiss type of acatalasemia. Blood Cells Molecular Diseases 2001; 27: 512-517. [\[31\]](#)
7. Góth L, Rass P, Pay A. Catalase enzyme mutations and their association with diseases. Molecular Diagnosis 2004; 8:141-149. [\[46\]](#)
8. Góth L. A kataláz enzim klinikai vonatkozásai és mutációi Magyarországon. Lege Artis Medicinae 2005; 15: 274-278. [\[4\]](#)
9. Taub J, Lau JF, Hahn JH, Hoque R, Rothblastt J, Chalfie M. A cytosolic catalase is needed to extend adult lifespan in C-elegans daf-C and Clk-1 mutants. Nature 1999; 399: 162-166.
10. Taub J, Lau JF, Hahn JH, Hoque R, Rothblastt J, Chalfie M. A cytosolic catalase is needed to extend adult lifespan in C-elegans daf-C and Clk-1 mutants (vol 399, pg162, 1999). Nature 2003;421: 764. Correction.
11. Schriener SE, Linford NJ, Martin GM, Treuting P, Ogburn CE, Emond M, Coskun PE, Ladiges W, Wolf N, VanRemmen H, Wallace DC, Rabinowitch PS. Extension of murine life span by overexpression of catalase targeted to mitochondria. Science 2005; 308: 1909-1919.
12. Góth L, Lenkey A, Bigler NW. Blood catalase deficiency and diabetes in Hungary. Diabetes Care 2001; 24: 445-447. [\[28\]](#)
13. Jermedy G. Hungarian register new and improved. Brit Med J 1994; 308: 134-135.
14. Heales SJR. Catalase deficiency, diabetes, and mitochondrial function. Lancet 2001; 357: 414.
15. Hansen LL, Ikeda I, Olsen GS, Busch AK, Mostha L. Insulin signaling is inhibited by micromolar concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Biol Chem 1999; 274: 25078-25084.
16. Tirosh A, Rudich A, Potashnik R, Bashan N. Oxidative stress impairs insulin but not platelet-derived growth factor signaling in 3T3-L1 adipocytes. Biochem J. 2001; 355: 757-763.
17. Cirri P, Chiarugi TP, Buricchi F, Caselli A, Paolo P, Giannoni E, Camici G, Manao R, Raugei G, Ramponi G. Insulin inhibits platelet-derived growth factor-induced cell proliferation. Mol Biol Cell 2005; 16: 73-83.
18. Hattersley AT. Beyond the beta cell in diabetes. Nature Gen 2006; 38: 12-13.
19. Góth L. Lipid and carbohydrate metabolism in acatalasemia. Clinical Chemistry 2000; 46:564-566. [\[37\]](#)
20. Góth L. Characterization of acatalasemia detected in two Hungarian sisters. Enzyme 1992; 46: 252-258. [\[36\]](#)
21. Góth L, Vitai M. Hungarian hereditary acatalasemia and hypocatalasemia are not associated with chronic hemolysis. Clinica Chimica Acta 1995; 233: 75-79. [\[35\]](#)
22. Góth L, Vitai M. The effects of hydrogen peroxide promoted by homocysteine and inherited catalase deficiency on human hypocatalasemic patients. Free Radicals in Biology and Medicine 2003; 35:882-888. [\[33\]](#)
23. Starkebaum G, Harlan DM. Endothelial cell injury due to copper-catalyzed hydrogen peroxide from homocysteine. J Clin Invest 1986; 77: 1370-1376.
24. Austin RC, Sood SK, Dorward AM, Singh G, Saughnessy SG, Pamidi S, Outinen PA, Weitz JI. Homocysteine dependent alteration in mitochondrial gene expression, function

- and structure: homocysteine and hydrogen peroxide act synergistically to enhance mitochondrial damage. *J Biol Chem* 1998; 273: 30808-30818.
25. Góth L, Dzsuzsák E. HLA-DRB allél típusok meghatározása AMPLICOR eljárással és megoszlásuk vizsgálata hypokatalazémiában. *Klin Kísérl Lab Med* 1997;24: 68-71. [\[34\]](#)
  26. Takahara S. Acatlasemia in Japan. In *Hereditary disorders of erythrocyte metabolism*. Beutler E ed. New York, Grane and Shratton, 1968 p 21-40.
  27. Aebi H, Wiss SR. Acatlasemia. In *The metabolic basis of inherited diseases*. Stanbury JB, Wingarden JB, Frederickson DS eds, 4<sup>th</sup> ed, New York, Mc Graw Hill 1977, p 1972-1807.
  28. Eaton JW, Ma M. Acatlasemia. In *The metabolic and molecular bases of inherited diseases*. Scriver CR, Beaudet A. eds 2<sup>nd</sup> ed, vol 2, New York, Mc Graw Hill, 1995, p 2371-2384.
  29. Kobayashi M, Sugiyama H, Wang DH, Toda N, Maeshima Y, Yamasaki Y, Masuoka N, Yamada M, Kira S, Makino H. Catalase deficiency renders remnant kidney more susceptible to oxidant injury and renal fibrosis in mice. *Kidney Internat* 2005; 68: 1018-1018.
  30. Góth L, Sussman H. Új módszerek a molekuláris biológiában: genomiális DNS szeparálás anioncserével, és nem radioaktív DNS detektálás. *Laboratóriumi Diagnosztika* 1993; 20: 274-278. [\[38\]](#)
  31. Góth L, Alizadeh BN. Az akatalazémia molekuláris genetikai vizsgálatához szükséges kataláz próba előállítás. *Laboratóriumi Diagnosztika* 1993; 20: 100-104. [\[40\]](#)
  32. Góth L, Fodor F, Bíró S. A polimeráz láncreakció (PCR) termékeinek analízise új módszerekkel. *Klin Kísérl Lab Med* 1996; 23: 11-16. [\[39\]](#)
  33. Góth L. Mutáció kimutatási módszerek. In Góth L. *Molekuláris biológiai diagnosztikai módszerek*. Debrecen 2002, Főiskolai jegyzet 46-53.
  34. Góth L. Mutáció kimutatási módszerek. In Dombrási V. *Molekuláris biológiai gyakorlatok Debrecen*. 2004. Egyetemi jegyzet.
  35. Góth L, Páy A. Genetic heterogeneity in acatalasemia. *Electrophoresis* 1996; 17: 1302-1303. [\[41\]](#)
  36. Góth L. Further genetic heterogeneity in acatalasemia. *Electrophoresis* 1997; 18: 1942-1943. [\[42\]](#)
  37. Góth L, Alizadeh BN, Sussman HH. Further characterization of Hungarian acatalasemia by HinfI polymorphism of catalase gene. *Enzyme Protein* 1993; 47: 156-159. [\[43\]](#)
  38. Góth L, Vitai M. Polymorphism of 5' of the catalase gene in Hungarian acatalasemia and hypocatalasemia. *Electrophoresis* 1997; 18: 1105-1108. [\[44\]](#)
  39. Góth L. Genetic heterogeneity of the 5' uncoding region of the catalase gene in human acatalasemic and hypocatalasemic subjects. *Clinica Chimica Acta* 1998; 271: 73-78. [\[45\]](#)
  40. Góth L, Rass P, Páy A. Catalase enzyme mutations and their association with diseases. *Molecular Diagnosis* 2004; 8: 141-149. [\[46\]](#)
  41. Góth L, Shemirani A, Kalmár T. A novel catalase mutation (a GA insertion) causes the Hungarian type of acatalasemia. *Blood Cells Molecular Diseases Dis* 2000; 26: 151-154. [\[47\]](#)
  42. Góth L, Gorzsás A, Kalmár T. A simple PCR-heteroduplex screening method for determination of a common mutation of the catalase gene in Hungary. *Clinical Chemistry* 2000; 46: 1190-1191. [\[48\]](#)
  43. Góth L. A novel catalase mutation (a G insertion in exon 2) causes the type B of the Hungarian acatalasemia. *Clinica Chimica Acta* 2001; 311: 161-163. [\[49\]](#)
  44. Góth L, Rass P, Madarasi I. A novel catalase mutation detected by polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism, nucleotide sequencing, and Westrn

- blot analyses is responsible for the type C of Hungarian acatalasemia. *Electrophoresis* 2001; 22: 49-51. **[50]**
45. Murphy MRN, Reid TJ Sicignano A, Tanaka N, Rossmann MG. Structure of beef liver catalase. *J Mol Biol* 1981; 152: 465-489.
  46. Fita I, Rossmann MG. The active center of catalase. *J Mol Biol* 1985; 185: 21-37.
  47. Putnam CD, Arvai AS, Bourne Y, Tailner JA. Active and inhibited catalase structures: Ligand and NADPH binding and catalytic mechanism. *J Mol Biol* 2000; 296: 295-309.
  48. Diaz A, Horjales E, Rudino-Pinera E, Arreola R, Hansberg W. Unusual Cys-Tyr covalent binding in a large catalase. *J Mol Biol* 2004; 342: 971-985.
  49. Góth L, Vitai M, Rass P, Sükei E, Páy A. Detection of a novel familial catalase mutation (Hungarian type D) and the possible risk of inherited catalase deficiency for diabetes mellitus. *Electrophoresis* 2005; 26: 1646-1649. **[51]**
  50. Wen JK, Osumi T, Hashimoto T. Molecular analysis of human acatalasemia: Identification of a splicing mutation. *J Mol Biol.* 1990; 211: 383-393.
  51. Hirono A, Sasaya-Hamada F, Kanno H, Fujji H, Yashida T, Miwa S. A novel human catalase mutation (358T-del) causing Japanese-type acatalasemia. *Blood Cells Mol Dis* 1995; 21: 232-234.
  52. Parboosingh JS, Rousseau M, Rogan F, Amit Z, Chertkov H, Jofnson WG, Manganaron F, Scipper HN, Curran TJ, Stossel J, Rouleau GA. Absence of mutations in superoxide dismutase and catalase in patients with Parkinson's disease. *Arch Neurol* 1995; 52: 1160-1163.
  53. Wally V, Buchroithner B, Klausegger A, Laimer M, Hintner H, Bauer JW. Acatalasemia: identification and characterization of a novel missense mutation. *J Invest Dermatol* 2004; 122: A85-A85 506. (Meeting Abstract).
  54. Vitai M, Fátai S, Rass P, Csordas M, Tarnai I. Simple PCR-hetroduplex,-SSCP mutation screening methods for detection of novel catalase mutations in Hungarian patients with type 2 diabetes mellitus. *Clin Chem Lab Med* 2005; 43: 1346-1350.
  55. Pui CH. Urate oxidase in the prophylaxis or treatment of hyperuricemia. *Seminar in Hematol* 2001; 38(S10): 13-21.
  56. Patte C, Sakiroglu C, Ansoyolo S, Brauchel A, Plouvier E, Pacquement H, Babin-Boilletot A. Urate oxidase in the prevention and treatment of metabolic complications in patients with B-cell lymphoma and leukemia, treated in the Societe Francaise d'Oncologie. *Pediatrique LMB89 protocol. Annals Oncol* 2002; 13: 789-795.
  57. Wossmann W, Schrappe M, Meyer U, Zimmerman M, Reiter A. Incidence of tumor lysis syndrome in children with advanced stage Burkitt's lymphoma/leukemia before and after introduction of prophylactic use of urate oxidase. *Annals Hematol* 2003; 82: 160-165.
  58. Baeksgaard L, Sorensen JB. Acute tumor lysis syndrome in solid tumors -a case report and review of the literature. *Cancer Chemother Pharmacol* 2003; 51: 187-192.
  59. Hamada Y, Kameyama Y, Iizuka T, Ishizaki T, Nishiyama T, Isshiki A. Methemoglobinemia from hydrogen peroxide in a patient with acatalasemia. *Anesthesiology* 2004; 101: 247-248 (case report).
  60. Takahara S, Miyomoto H. Three cases of progressive oral gangrene due to lack of catalase in the blood (in Japanese). *Nihonn Jibi Inkoka Gakkai Kaiho (J Otorhinolaryngological Soc Japan: Japan J Otol)* 1948; 51: 163.
  61. Takahara S. Progressive oral gangrene probably due to lack of catalase in the blood (acatalasemia). *Lancet* 1952; 2: 1101-1104.
  62. Pfügler G, Kaiser E. Acatalasia discovered by accident during a disk operation. *Arch Orthop Trauma Surg* 1988; 107: 189-190.
  63. Chen Q, Espey MG, Krishna MC, Mitchell JB, Corpe CP, Buettner GR, Schacter E, Levine M. Pharmacologic ascorbic acid concentration selectively kill cancer cells: Action

as a pro-drug to deliver hydrogen peroxide to tissues. Proc Natl Acad Sci (USA) 2005: 102: 13604-13609.

## **6. 4. TECHNIKAI ÚJÍTÁSOK**

### **6. 4. 1. Kataláz izoforma kimutatási eljárás**

Egy eljárást dolgoztam ki a szérumban, vér szöveti kataláz izoenzim/izoforma detektálására, amellyel kizártam a szérumban kataláz izoenzimeket, és azonosítottam a szöveti izoformákat.

Góth L. No catalase isoenzymes in serum. Clinical Chemistry 1987: 33: 2302-2303.

Góth L. Serum catalase: Reversibly formed charge isoform of erythrocyte catalase. Clinical Chemistry 1991: 37: 2043-2047.

### **6. 4. 2. A szérumban kataláz diagnosztikai értékelését segítő algoritmus**

A szérumban kataláz több megbetegedésben, patológias folyamatban is jelentősen emelkedik. Ezen folyamatok közötti differenciálást segíti ez az algoritmus, amely működéséhez a szérumban katalázon kívül, további rutin laboratóriumi mérési eredményeket igényel és használ fel. Az úttörő jellegű próbálkozásnál már alkalmazott döntési stratégiák fejlett változatai napjainkban nyernek további alkalmazást az autovalidálásban, a bizonyítékon alapuló orvoslásban/diagnosztikában, amit a számítástechnika jelenlegi fejlett színvonala tesz lehetővé.

Góth L. Laboratóriumi eredmények diagnosztikai jelentőségének növelése számítógép alkalmazásával, különös tekintettel a polarográfiás kataláz meghatározásra. Kórház és Orvostechika 1986: 26: 150-152.

### **6. 4. 2. Spektrofotometriás szérumban kataláz meghatározás**

A szérumban kataláz enzim aktivitásra kifejlesztett, egyszerű és olcsó meghatározási módszeremet alkalmazzák, főként a nemzetközi kataláz kutatásban. A módszer adaptálható vér és más kataláz tartalmú minták kataláz aktivitásának meghatározására.

Góth L. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. Clinica Chimica Acta 1991: 196: 143-152.



### **6. 4. 3. Mutáció szűrési eljárás A**

Egyszerű eljárást dolgoztam ki a magyarországi A típusú akatalazémia genetikai szűrésére, amely egy egyszerűsített PCR-heteroduplex kimutatási eljárás.

Góth L, Gorzsás A, Kalmár T. A simple PCR-heteroduplex screening method for determination of a common mutation of the catalase gene in Hungary. *Clinical Chemistry* 2000; 46: 1190-1191.

A módszeremet alkalmazva detektáltak újabb diabeteses katalázhiányos egyéneket Magyarországon egy genetikai szűrővizsgálat során.

Vitai M, Fátrai S, Rass P, Csordas M, Tarnai I. Simple PCR-heteroduplex,-SSCP mutation screening methods for detection of novel catalase mutations in Hungarian patients with type 2 diabetes mellitus. *Clin Chem Lab Med* 2005; 43: 1346-1350.

### **6. 4. 4. Mutáció szűrési eljárás B**

A kataláz gén 9. exonja polimorfizmusának vizsgálatára alkalmas, egyszerű mutáció szűrési eljárást dolgozunk ki. Az eljárás a megfelelően tervezett spontán kialakuló, egyszálú PCR termékek konformációs különbözőséget használja fel. Ezzel az eljárással történő mutációszűrés eredményezte a magyarországi akatalazémia E típusának felderítését.

Az eljárás szabadalmaztatása folyik.

## **7. A LEGFONTOSABB ÚJ EREDMÉNYEIM**

- 1.** A hidrogénperoxid paradoxon értelmezése és a kataláz enzim szerepének újraértékelése irodalmi adatok alapján.
- 2.** A szérumban kataláz referens tartományának meghatározása és kataláz aktivitás jelentősége hemolitikus folyamatokban.
- 3.** A szérumban kataláz meghatározás jelentőségének kritikai elemzése és diagnosztikai hatékonyságának növelésére végzett próbálkozások.
- 4.** A szérumban kataláz szerv/szövet eredetének meghatározása referens egyéneknél és különböző patológiai állapotokban.
- 5.** Kataláz enzim meghatározási módszerek kifejlesztése: kataláz izoformok detektálására, a szérumban/vér kataláz aktivitás spektrofotometriás meghatározására, amelyek nemzetközi alkalmazást nyertek.
- 6.** Humán vér kataláz tisztítási módszer kidolgozása.
- 7.** A vér kataláz aktivitás referens tartományának meghatározása, és az aktivitásának vizsgálata anémiákban, tumorokban, szizophreniában, diabetes mellitusban, vitiligóban, diabetes mellitusban.
- 8.** A reverzibilis kataláz izoformok: a szérumban és vörösvértest kataláz kapcsolatának meghatározása, hagyományos és új technikákkal.
- 9.** A szérumban és vér kataláz változások bemutatására kifejlesztettem egy új ábrázolási formát, a diagnosztikai hálót.
- 10.** Új molekuláris genetikai módszerek bevezetése a hazai klinikai laboratóriumi gyakorlatba (PCR-SSCP, PCR-heteroduplex, nem radioaktív detektálás, próba előállítás).
- 11.** Új a DNS polimorfizmus szűrési módszerek kidolgozása.
- 12.** Az örökletes kataláz hiány magyarországi felderítési stratégiájának, és a szindrómáért felelős mutáció kimutatási stratégiájának kidolgozása és ezeknek a gyakorlatban történő sikeres alkalmazása.
- 13.** Az örökletes kataláz hiány egy új formájának a magyarországi formának a leírása.
- 14.** A kataláz hiány és a diabetes közti lehetséges kapcsolat leírása.
- 15.** A magyarországi örökletes kataláz hiány 5 genetikai típusának meghatározása és jellemzése
- 16.** A Magyarországi akatalazémia klinikai, klinikai biokémia és genetika jellemzése alapján, egy új szindrómának, a veleszületett kataláz hiánynak a felismerése.
- 17.** A korábbi eredményeim (szérumban kataláz diagnosztikai algoritmus, kataláz molekulatömeg, MCV, vörösvértest kataláz szerepe akut myocardialis infarctusban és pancreatitisben) magyarázata a mai irodalmi adatok és saját újabb eredményeim alapján.

## 8. KÖZLEMÉNYEIM

### 8.1. A KANDIDÁTUSI FOKOZAT MEGSZERZÉSE ELŐTTI

#### KÖZLEMÉNYEK

1. **Góth L.:** Humán vérszérum kataláz enzim aktivitásának meghatározása.  
*Műszaki doktori értekezés* Veszprém, Sümeg, 1971.
2. Mészáros I., **Góth L.**, Vattay Gy.: The value of serum catalase activity determination in acute pancreatitis.  
*The American Journal of Digestive Diseases* 1973; 40: 1035-1041. **IF: 1,161**
3. **Góth L.**, Mészáros I.: Módszer a szérum karbamid szintjének meghatározására.  
*Orvosi Hetilap* 1973; 114: 634-635.
4. **Góth L.:** Polarographic determination of serum catalase activity.  
*Hungarian Scientific Instruments* 1975; 32: 13-16.
5. **Góth L.**, Németh H., Mészáros I.: Eljárás vérkonzervek hemolízisének meghatározására.  
*Transfusio* 1977; 10: 124-128.
6. **Góth L.**, Illés E.: Eljárás a szérum fehérjéhez kötött jód koncentrációjának meghatározására  
*Laboratóriumi Diagnosztika* 1977; 4: 88-90.
7. **Góth L.:** Szérum kataláz enzim aktivitás meghatározás programozható polarográfval  
*Kórház- és Orvostechika* 1982; 20: 6-9.
8. **Góth L.:** Determination of catalase enzyme activity in human tissues by programmable polarograph.  
*Hungarian Scientific Instruments* 1982; 53: 43-46.
9. **Góth L.**, Mészáros I., Németh H.: Serum catalase enzyme activity in acute pancreatitis.  
*Clinical Chemistry* 1982; 28: 1999-2000. **IF: 6,501**
10. **Góth L.**, Németh H., Mészáros I.: A szérum kataláz enzim aktivitásának változása szívinfarktusbán.  
*Laboratóriumi Diagnosztik.* 1982; 9: 99-101.
11. Mészáros I., Ládics O., Czehelnik R., **Góth L.**, Németh H., Tóth A.: Hiperlipémiával együtt észlelt akut pancreatitis.  
*Orvosi Hetilap* 1982; 123: 2649-2653.
12. **Góth L.:** A humán szérum kataláz enzim elektroforetikus tulajdonságának vizsgálata.  
*Kísérletes Orvostudomány* 1983; 35: 402-407.
13. **Góth L.**, Németh H., Mészáros I.: Serum catalase activity for detection of hemolytic diseases.  
*Clinical Chemistry* 1983; 29: 741-742. **IF: 6,501**

- 14.Góth L.,** Mészáros I., Németh H.: A szérumb kataláz enzim aktivitásának változása mérgezésekben.  
*Egészségtudomány* 1983; 27: 149-154.
- 15.Góth L.,** Németh H., Mészáros I.: A szérumb kataláz enzim aktivitása máj és epebetegségekben.  
*Laboratóriumi Diagnosztika* 1983; 10: 18-20.
- 16.Góth L.,** Mészáros I., Németh H.: A szérumb kataláz enzim aktivitásának vizsgált szíveredetű keringési elégtelenségben.  
*Magyar Belorvosi Archívum* 1983; 36: 39-46.
- 17.Góth L.:** A szérumb kataláz enzim aktivitásának meghatározása, klinikai kémiai jellemzése és diagnosztika jelentősége  
*Kandidátusi értekezés* MTA Biológiai Osztály, Sümeg, Budapest 1984

A kandidátusi értekezés előtti közlemények összesített impakt faktora: 14,163

## **8.2. AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK**

Impakt Faktor a legutolsó (2004) IF lista alapján

- 1. Góth L.** Az enzimdiagnosztika egyik legkorábbi enzime a kataláz.  
**Orvosi Hetilap** 1992;133: 499-501.
- 2. Góth L.** Az oxidatív stressz és a kataláz enzim.  
DOTE, **Egészségügyi Főiskolai Kar Tudományos Közleményei.**  
Nyíregyháza, 1998; 1: 73-80.
- 3. Góth L.** A kataláz enzim szerepe a hidrogénperoxid metabolizmusban, az enzim csökkent működése vagy veleszületett hiánya.  
**Orvosképzés** 1997; 72: 59-63.
- 4. Góth L.** A kataláz enzim klinikai vonatkozásai és mutációi Magyarországon.  
**Lege Artis Medicinae** 2005: 15: 274-278.
- 5. Góth L.** A hidrogénperoxid paradoxon.  
**Orvosi Hetilap** Szerkesztőség felkérésére. 2006.
- 6. Góth L,** Vitai M, Mészáros I. A hidrogénperoxid polarográfiás féllépcsőpotenciájának változása a szérumb fehérje mátrixának hatására.  
**Klinikai és Kísérletes Laboratóriumi Medicina** 1997; 24: 203-206.

- 7. Góth L, Mészáros I, Németh H.** Serum catalase enzyme activity in liver diseases.  
**Acta Biologica Hungarica** 1987; 38: 287-290. **IF: 0,425**
- 8. Góth L, Vitai M, Mészáros I.** Vérzéses anémia és extravaszkuláris hemolízis együttes előfordulása.  
**Laboratóriumi Diagnosztika** 1992; 19: 247-249.
- 9. Góth L, Scheller Gy.** A hemolitikus urémiás szindróma laboratóriumi jelei.  
**Laboratóriumi Diagnosztika** 1991;18: 56-57.
- 10. Góth L, Mészáros I, Németh H.** A szérum kataláz meghatározás diagnosztikai jelentősége.  
**Orvosképzés** 1989; 64: 257-264.
- 11. Fazekasné Kis Mária, Góth L.** A ROC analízis alkalmazása az enzim diagnosztikában.  
**Klinikai és Kísérletes Laboratóriumi Medicina** 2000; 26: 184-186.
- 12. Góth L, Illés E.** A különböző eredetű kataláz enzimek hidrogénperoxidbontó képességének függése a hidrogénperoxid koncentrációtól.  
**Kísérletes Orvostudomány** 1985; 37: 607-612.
- 13. Góth L.** Heat and pH dependence of catalase. A comparative study.  
**Acta Biologica Hungarica** 1987; 38: 279-285. **IF: 0,425**
- 14. Góth L.** No catalase isoenzymes in serum.  
**Clinical Chemistry** 1987; 33: 2302-2303. **IF: 6,501**
- 15. Góth L.** Serum catalase: reversibly formed charge isomer of erythrocyte catalase.  
**Clinical Chemistry** 1991; 37: 2043-2047. **IF: 6,501**
- 16. Góth L.** Laboratóriumi eredmények diagnosztikai jelentőségének növelése számítógép alkalmazásával, különös tekintettel a polarográfiás kataláz meghatározásra.  
**Kórház- és Orvostechnika** 1986; 26: 150-152.
- 17. Góth L.** Origin of serum catalase activity in acute pancreatitis.  
**Clinica Chimica Acta** 1989; 186: 39-44. **IF: 1,961**

- 18. Góth L.** Origin of serum catalase in healthy subjects and in some hematological diseases.  
**Clinical Chemistry and Enzymology Communications** 1989; 1: 329-334.
- 19. Góth L.** A kataláz enzim és a pancreatitis acuta.  
**Orvosi Hetilap** 1997; 138: 825.
- 20. Góth L.** Origin of serum catalase in acute liver congestion due to cardiac circulatory failure.  
**Clinical Chemistry and Enzymology Communications** 1991; 4: 51-56.
- 21. Góth L.** A szérum kataláz eredete egészségeseknél és különböző megbetegedésekben.  
**Lege Artis Medicanae** 1993; 3: 922-928.
- 22. Góth L.** A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range.  
**Clinica Chimica Acta** 1991; 196: 143-152. **IF: 1,961**
- 23. Góth L.** Effect of age, sex and smoking on serum catalase activity.  
**Acta Biologica Hungarica** 1989; 40 :395-399. **IF: 0,425**
- 24. Góth L.** Human erythrocyte catalase, isolation with an improved method, characterization and comparison to bovine liver catalase  
**Enzyme** 1989; 41: 191-198. **IF: 1,516**
- 25. Vitai M, Góth L.** Reference ranges of normal blood catalase activity and levels in familial hypocatalasemia in Hungary.  
**Clinica Chimica Acta** 1997; 261 35-42. **IF: 1,961**
- 26. Góth L, Vitai M.** Hypocatalasemia in hospital patients.  
**Clinical Chemistry.** 1996;42:341-342. **IF: 6,501**
- 27. Góth L, Tóth Z, Tarnai I, Bérces M, Török P, Bigler WN.** Blood catalase activity in gestational diabetes is decreased but not associated with pregnancy complications.  
**Clinical Chemistry** 2005; 51: 2401-2404. **IF: 6,501**
- 28. Góth L, Bigler N, Lenkey Á.** Blood catalase deficiency and diabetes in Hungary.  
**Diabetes Care** 2001; 24: 1839-40. **IF: 7,071**

- 29. Góth L.** Two cases of acatalasemia in Hungary.  
**Clinica Chimica Acta** 1992, 207:155-158. **IF: 1,961**
- 30. Góth L.** Öröklődő kataláz-enzimhiányos állapotok Magyarországon.  
**Orvosi Hetilap** 2000; 141: 445-447.
- 31. Góth L.** A new type of inherited catalase deficiencies: its characterization and comparison to the Japanese and Swiss type of acatalasemia.  
**Blood Cells Molecules and Disease.** 2001: 27: 512- 517. **IF: 2,549**
- 32. Góth L,** Eaton JW. Hereditary catalase deficiencies and increased risk of diabetes.  
**Lancet** 2000; 356 :1821-1822. **IF: 21,713**
- 33. Góth L,** Vitai M. The effect of hydrogen peroxide promoted by homocisztein and inherited catalase deficiency in human hypocatalasemic patients.  
**Free Radicals in Biology and Medicine** **2003; 31: 490-498.** **IF: 5,625**
- 34. Góth L,** Dzsudzsák E. HLA-DRB allél típusok meghatározása Amplicor eljárással és megoszlásuk vizsgálata hypokatalazémiában.  
**Klinikai és Kísérletes Laboratóriumi Medicina** 1997; 24:68-71.
- 35. Góth L,** Vitai M. Hungarian hereditary acatalasemia and hypocatalasemia are not associated with chronic hemolysis.  
**Clinica Chimica Acta** 1995; 33: 75-79. **IF: 1,961**
- 36. Góth L.** Characterization of acatalasemia detected in two Hungarian sisters.  
**Enzyme** 1992; 46: 252-258. **IF: 1,516**
- 37. Góth L.** Lipid and carbohydrate metabolism in acatalasemia.  
**Clinical Chemistry** 2000; 46: 564-566. **IF: 6,501**
- 38. Góth L,** Sussman HH. Új módszerek a molekuláris biológiában: genomiális DNS szeparálás anioncserével és nem radioaktív detektálással.  
**Laboratóriumi Diagnosztika** 1993; 20: 274-278.
- 39. Góth L,** Fodor F, Biró S. A polimeráz láncreakció (PCR) termékeinek analízise új módszerekkel.  
**Klinikai és Kísérletes Laboratóriumi Medicina** 1996; 23: 11-16.
- 40. Góth L,** Alizadeh BN. Az akatalazémia molekuláris genetikai vizsgálatához szükséges kataláz próba előállítás.  
**Laboratóriumi Diagnosztika** **1993; 20: 100-104.**

- 41. Góth L, Páy A. Genetic heterogeneity in acatalasemia. *Electrophoresis* 1996; 17: 1302-1303. **IF: 3,743****
- 42. Góth L. Further genetic heterogeneity in acatalasemia *Electrophoresis* 1997;18: 1942-1943. **IF: 3,743****
- 43. Góth L, Alizadeh BN, Sussman HH. Further characterization of Hungarian acatalasemia by Hinf 1 polymorphism of catalase gene. *Enzyme and Protein* 1993; 47: 156-159. **IF: 4,08****
- 44. Góth L, Vitai M. Polymorphism of 5' of the catalase gene in Hungarian acatalasemia and hypocatalasemia. *Electrophoresis* 1997; 18: 1105-1108. **IF: 3,743****
- 45. Góth L. Genetic heterogeneity of the 5' uncoding region of the catalase gene in Hungarian acatalasemic and hypocatalasemic subjects. *Clinica Chimica Acta* 1998; 271: 73-78. **IF: 1,961****
- 46. Góth L, Rass P, Páy A. Catalase enzyme mutations and their association with diseases. *Molecular Diagnosis* 2004; 8: 141-149. **IF: 2,562****
- 47. Góth L, Shemirani A, Kalmár T. A novel catalase mutation (a G A insertion) causes the Hungarian acatalasemia. *Blood Cells, Molecules and Diseases* 2000; 26: 151-154. **IF: 2,549****
- 48. Góth L, Gorzsás A, Kalmár T. A simple PCR- heteroduplex screening method for detection of a common mutation in the catalase gene in Hungary. *Clinical Chemistry* 2000; 46: 1199-2000. **IF: 6,501****
- 49. Góth L. A novel catalase (a G insertion in exon 2) causes the type B of the Hungarian acatalasemia. *Clinica Chimica Acta* 2001; 311: 161-163. **IF: 1,961****
- 50. Góth L, Rass P, Madarasi I. A novel catalase mutation detected PCR-SSCP, nucleotide sequencing and Western blot analyses is responsible for the type C of Hungarian acatalasemia. *Electrophoresis* 2001; 22: 49-51 **IF:3,743****
- 51. Góth L, Vitai M, Rass P, Sükei E, Páy A. Detection of a novel catalase mutation (Hungarian type D) and the possible risk of inherited catalase deficiency for diabetes mellitus.**



Kumulatív impakt faktor: 122,405 (a legutolsó lista alapján)  
Független hivatkozások: nemzetközi: 208 , hazai: 51, összesen: 259

### **8.3. A KANDIDÁTUSI ÉRTEKEZÉST KÖVETŐ EGYÉB KÖZLEMÉNYEK**

1. **Góth L.:** Transzferrin receptorok.  
*Laboratóriumi Diagnosztika* 1987: 14: 232-233.
2. **Góth L.,** Mészáros I.: Tévesen pozitív immunoinhibíciós CK-MB aktivitás: a makro CK 2-es típusú variánsának ismertetése.  
*Laboratóriumi Diagnosztika* 1988: 15:19-22.
3. **Góth L.:** Beckman Glükóz Analizátor 2 ismertetése.  
*Laboratóriumi Diagnosztika* 1988: 15: 101-103.
4. **Góth L.,** Mészáros I., Scheller Gy.: Hyperamylasemia and  $\alpha$ -amylase isoenzymes in acute liver congestion due to cardiac circulatory failure.  
*Clinical Chemistry* 1989: 35: 1795-1799. **IF: 6,501**
5. **Góth L.,** Kutor J., Mészáros I., Scheller Gy.: Hiperamilázémia és alfa-amiláz izoenzimek.  
*Laboratóriumi Diagnosztika* 1990: 17: 221-223.
6. **Góth L.,** Sarudi S.: DIAPACK (DIALAB) reagensek alkalmazhatóság HITACHI 717 klinikai kémiai analizátoron..  
*Klinikai és Kísérletes Laboratóriumi Medicina* 1995: 22: 253-256.
7. **Góth L.,** Sarudi S., Rácz É.: Immunturbidimetriás meghatározások  
*Klinikai és Kísérletes Laboratóriumi Medicina* 1997: 24: 72-74.
8. Furka I., Miko I., Tóth K., Furka A., Kappelmayer J., **Góth L.** et al.: Hematological, Hemorheological and catalase level changes following splenectomy and spleen autotransplantation in experimental animals.  
*Acta Chirurgica Austriaca* 1997: 137: 31-32.
9. **Góth L.** A fehérjekutatás a klinikai enzimológiai gyakorlatban: a kreatinkináz és alkalikus foszfatáz enzimek polimorfizmusa.  
*Orvosi Hetilap* 2002: 143: 1021-5.
10. **Góth L.** A betegágy melletti laboratóriumi vizsgálatok.  
*Hippocrates* 2003: 5: 133-5.
11. **Góth L,** Bigler WN. CK-2 antibody (Conan) recognesis cancer associated ectopic form of CK-2.  
*Clinica Chimica Acta* 2003: 329: 153-155. **IF: 1,961**
12. **Góth L.** Laboratóriumi eredmények értékelése és a laboratóriumi automatizáció.  
*Hippocrates* 2004: 6: 35-39.

## 8.4. KÖNYVFEJEZETEK

- 1.Góth L.:** Physiology and structure of catalase and its determination in clinical practice. In Oxygen Free Radicals and Tissue Injury. Eds. Matkovics B., Boda D., Halász H. **Akadémiai Kiadó**, Budapest 1988. p 111-117.
- 2.Góth L.** A betegek által végzett laboratóriumi vizsgálatok jelenlegi helyzete, lehetőségei, korlátai. In Orális anticoagulálás-prótrombin önvizsgálat. Szerk: Pusztay J. Genius Sovarenis Alapítvány, Szombathely 2001, p 11-19.
- 3.Góth L.** A Marfan szindróma molekuláris genetikája. In Aorta Dyssection.
- 4.Góth L.** A hidrogénperoxid metabolizmus, szabályozó enzime a kataláz, és ennek veleszületett hiánya. In Enzimopáthiák . Szerk: László A. Új kiadás. In press.

### Egyetemi jegyzet

- 1.Góth L.:** Automatizált szekvencia analízis. Mutáció kimutási módszerek fejezetek írása.  
In Molekuláris biológiai gyakorlatok. Szerk: Dombrádi V. Debreceni Egyetem, 2004. 219-228, 229-235.
- 2.Góth L.** közreműködő.
  - a.In Klinikai Biokémia Gyakorlatok. Muszbek L, Kappelmayer J. (eds). 3. javított kiadás. DOTE.2000.
  - b.In Practicals in Clinical Biochemistry. Muszbek L, Kappelmayer J (eds). DOTE.2000.

### Főiskolai jegyzet

- 1. Góth L.** Molekuláris biológiai diagnosztikai módszerek. Debreceni Egyetem 2002.
- 2. Góth L.** Általános klinikai laboratóriumi ismeretek, Debrecen 2006.
- 3. Góth L.** Klinikai kémiai diagnosztikai módszerek, Debrecen, 2006.
- 4. Góth L.** Kelemen J. (szerkesztők) Orvosdiagnosztikai Laboratóriumi Anatólikus Írásbeli Záróvizsga Kérdés Gyűjtemény. Debrecen-Kaposvár. 2003.

## 9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton köszönöm a munkámhoz nyújtott segítséget, támogatást és türelmet:

### **Családomnak**

#### **Munkahelyi vezetőimnek**

dr. Mészáros István igazgató-főorvos

(Városi Kórház, Sümeg)

Prof. Dr. Muszbek László akadémikus, intézetigazgató

Klinikai Kutató Központ, Debreceni Egyetem, OEC

#### **Munkatársaimnak**

Laboratórium (Városi Kórház, Sümeg)

Klinikai Biokémiai és Molekuláris Patológiai Intézet (DE,

OEC)

Klinikai Kémiai Analitikai Tanszék (DE, EFK, ODLA)

#### **Támogatóimnak**

Prof. Dr. Jobst Kázmér, akadémikus

Fulbright Association

OTKA

ETT

Zsigmond Diabetes Alapítvány

a

**Művésznem,**

aki elkészítette az itt látható művészi képet kataláz enzimről



A kataláz enzim

