

**FINSKA SUOMEN**  
**KEMISTSAMFUNDETS KEMISTISEURAN**  
**MEDDELANDEN TIEDONANTOJA**

REDAKTÖR — TOIMITTAJA

**Tor-Magnus Enari**

INNEHÅLL — SISÄLTÖ

K. Mäkinen: Entsyymien ominaisuuksista .....	6
N.-E. Saris: Om enzymers intracellulära lokalisation .....	24
P. Rintola: Plasman entsyymiaktiivisuuksien dynamiikka .....	31
E. Levonen: Isoentsyymeistä .....	41
H. Saukkonen: Entsyymien määrityksessä huomioon otettavat tekijät .....	47
L. K. Korhonen: Kudosnäytteiden entsyymihistokemiallisesta tutkimuksesta .....	57



kontrollit  
tulosten  
varmistamiseksi

Entsyaattisiin määrittäksiin

Enza-trol  
Enza-trol X  
Moni-trol I  
Moni-trol II

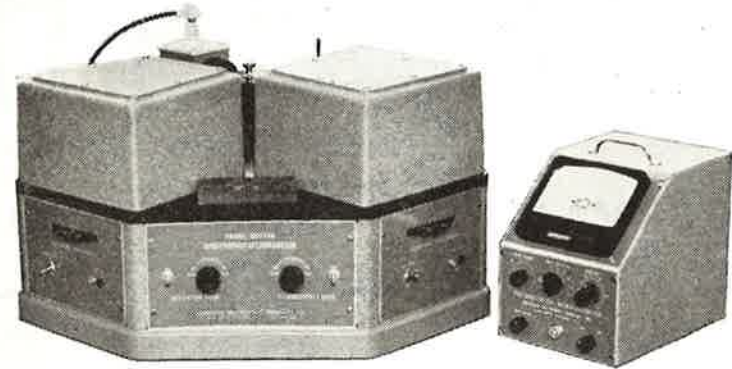
UUTUUS  
**CPK-CONTROL**

ja uusimpien menetelmien  
mukaiset CPK-reagenssit

Yksinedustaja: 1. 4. 1968 lähtien

**DADE FENNICA OY**

## AMINCO-BOWMAN SPEKTROFOTOFLUOROMETRI



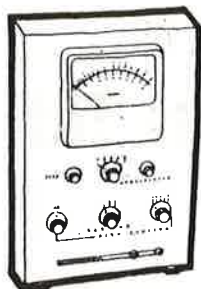
on monipuolinen tutkimus- ja rutiinifotometri. Soveltuu fluoresenssi- ja fosforesenssitutkimuksiin mitä erilaisimmissa biokemiallisissa kysymyksissä. Sekä heijastevalon että fluoresenssi- valon aallonpituus on säädettävissä joko käsin tai automaattisesti 200-800 sekä 400-1000 (tai 600-1200) mm.

Päädustaja:

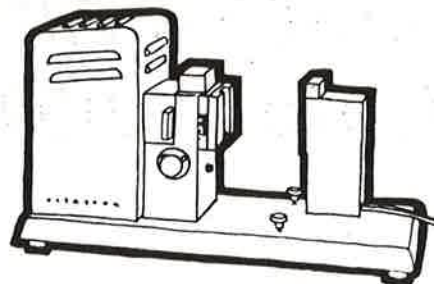
**INSTRUMENTARIUM**

Laboratorio-osasto

Mikonkatu 6, Helsinki 10, Puh. 15 011



Vahvistin



Optinen perusyksikkö



6-kyvetin vaihtaja

## ENTSYMAATTISIIN TUTKIMUKSIIN VITATRON UFD 450

### FOTOMETRILAITTEISTO:

- Optinen perusyksikkö varustettuna magneettisella stabilisaattorilla ja UV-lampulla.
- Termostoitava 6- tai 24-kyvetin automaattinen kyvetinvaihtaja ohjausyksiköineen, 6 eri mitausväliä 30 sekunnista 30 minuuttiin.
- Vahvistinosa ekstinktio-transmissiomittareineen ja säätimineen.
- Piirturina Vitatron Lin/Log integroiva piirturi UR 100.
- Laitteistoon voi liittää myös numeerisen tulosyksikön.



24-kyvetin vaihtaja



Lin/Log-piirturi

Järjestämme pyynnöstä esittelyn.

## LÄÄKETUKKU OY

Röntgen- ja laboratorio-osasto  
Vattuniemenkuja 1 – Helsinki 20  
Puh. 673 191/24 53 82, suor. 679 158

PS. Muistakaa myös laboratoriolasi- ja tutkimuskemikaliosastomme.

## KEMIKAALIVARASTOMME

lajivalikoima on suunniteltu erityisesti

## SAIRAALALABORATORIOITA

varten

Lisäksi olemme erikoistuneet

harvinaisten kemikaalien hankintaan.

Erittäin hyvien ulkomaisten yhteyksien avulla suoritamme tällaiset hankinnat nopeasti.

## YLIOPISTON APTEEKKI

KEMIKAALIOSASTO  
KALLIOLANRINNE 6, HELSINKI 51  
PUH. 717100

**FINSKA  
KEMISTSAMFUNDETS  
MEDDELANDEN**

**Annonspris**  
på annonsidor,  $\frac{1}{4}$  sida 150:—  
—, —  $\frac{1}{2}$  sida 80:—  
på bakpärmen, hela sidan 200:—

**Prenumerationspris**  
i Finland 15:—  
till utlandet 18:—

**Annoser  
och prenumerationsärenden**  
Fil. mag. Björn Holm  
Kaserngatan 16 A 9 a  
Helsingfors 13  
Telefon 46 04 11/323

**SUOMEN  
KEMISTISEURAN  
TIEDONANTOJA**

**Ilmoitushinnat**  
ilmoitussivuilla,  $\frac{1}{4}$  sivu 150:—  
—, —  $\frac{1}{2}$  sivu 80:—  
takakannessa, koko sivu 200:—

**Tilauhint**  
Suomessa 15:—  
Ulkomailla 18:—

**Ilmoitus- ja tilausasiat**  
Fil. maist. Björn Holm  
Kasarminkatu 16 A 9 a  
Helsinki 13  
Puhelin 46 04 11/323

**FINSKA  
KEMISTSAMFUNDETS  
MEDDELANDEN**

**SUOMEN  
KEMISTISEURAN  
TIEDONANTOJA**

77 årg.

1968 N:o 1

77 vuosik.

Utgiven av — Julkaisija — Publisher  
Finska Kemistsamfundet — Suomen Kemistiseura — Chemical Society of Finland  
Postbox 10476 Postilokero  
Helsingfors — Helsinki

Styrelse — Hallitus  
KAJ FORSS — TOR-MAGNUS ENARI — TERJE ENKVIST — JARL JOHAN LINDBERG — NILS-  
ERIK SARIS — KARIN SANDELIN — JACOBUS SUNDMAN — VERONICA SUNDMAN

Sekreterare — Sihteeri  
LARS ANDERSEN, N. Hesperig. 7 A P. Hesperiank. Helsingfors 26 Helsinki, tel. 49 08 78 puh.

Kassör — Rahastonhoitaja  
BJÖRN HOLM, Kaserng. 16 A 9 Kasarmink. Helsingfors 13 Helsinki, tel. 46 04 11/323, 63 96 70 puh.

Arkivare — Arkistonhoitaja  
ANJA ANDERSEN, N. Hesperig. 7 A P. Hesperiank. Helsingfors 26 Helsinki, tel. 49 08 78 puh.

Redaktör — Toimittaja  
TOR-MAGNUS ENARI, Morsviksvägen 1 Maamonlähentie tel. 64 75 46, 67 48 24 puh.  
Helsingfors 20 Helsinki

**CONTENTS**

K. Mäkinen: Properties of enzymes .....	6
N.-E. Saris: Intracellular localisation of enzymes .....	24
P. Rintola: Dynamics of blood plasma enzymes .....	31
E. Levonen: Isoenzymes .....	41
H. Saukkonen: On the determination of enzymes .....	47
L. K. Korhonen: Enzyme histochemical investigations of tissue preparations .....	57

## Entsyymien ominaisuuksista\*

Kauko Mäkinen

*Hammaslääketieteen laitos, Turun Yliopisto, Turku*

Entsyymit ovat proteiineja, jotka lisäävät kemiallisten reaktioiden nopeutta, mutta eivät vaikuta lopullisten reaktiotuotteiden luonteeseen, ts. ne toimivat katalyytteinä. Monet reaktiot, jotka tavallisesti tapahtuvat vain äärimmäisissä lämpötiloissa tai äärimmäisissä happo- tai emäsväkevyyksissä, tapahtuvat sopivan entsyymin läsnäollessa nopeasti ja kvantitatiivisesti lähellä neutraalia olevissa pH-arvoissa ja huoneenlämmössä. Toiseksi, useimmat entsyymireaktiot ovat spesifisiä katalysoidun reaktion luonteen ja käytetyn substraatin rakenteen suhteen. Entsyymien katalysoimien reaktiotyyppien spektri on laaja. Entsyymit katalysoivat esimerkiksi hydrolyyttisiä reaktioita, polymeraatioita, hapetuspelkistysreaktioita, dehydraatioita, aldolikondensaatioita, asyyliiryhmien siirtoreaktioita ja vapaiden radikaalien reaktioita. Proteiinit ovat toisin sanoen hyvin monipuolisia katalyyttejä. Taulukossa 1 on esitetty, millä tavalla International Union of Biochemistry suosittelee entsyymit jaettavaksi systemaattisesti.

- |                              |  |
|------------------------------|--|
| 1. OKSIDOREDUKTAASIT         | Katalysoivat hapetus-pelkistysreaktioita   |
| 2. TRANSFERAASIT             | Katalysoivat ryhmien siirtoreaktioita  |
| 3. HYDROLAASIT               | Katalysoivat hydrolyyttisiä reaktioita   |
| 4. LYAASIT                   | Katalysoivat ryhmien lisäämistä kaksoissidoksiin ja päinvastoin  |
| 5. ISOMERAASIT               | Katalysoivat isomeraatioita  |
| 6. LIGAASIT<br>(SYNTETAASIT) | Katalysoivat ATP:n tai muun trifosfaatin pyrofosfaattisidoksen katkeamiseen kytkeytyvää kahden molekyylin kondensaatiota |

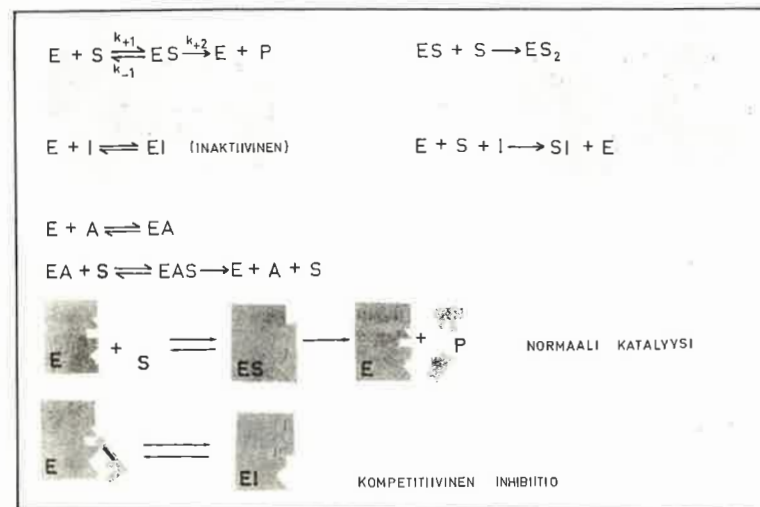
*Taulukko 1.* Entsyymien katalysoimien reaktioiden luokittelu ja entsyymien nimeäminen (Commission on Enzymes of the International Union of Biochemistry'n mukaan (1)). Jokainen näistä ryhmistä jakautuu vielä eri ryhmiin ja nämä vuorostaan alaryhmiin.

Itse entsyymien toiminta on monien solussa tapahtuvien reaktioiden kontrolloima. Niiden biosynteesi ja niiden lopullinen konsentraatio solussa on geneettisesti kontrolloitua ja pienet molekyylit, kuten esim. substraatti ja lopputuotteet, vaikuttavat entsyymien ominaisuuksiin. Ne voivat esiintyä solussa

\* Esitelmä Kemian päivien klinisen biokemian symposiumissa Helsingissä 26. 10. 67.

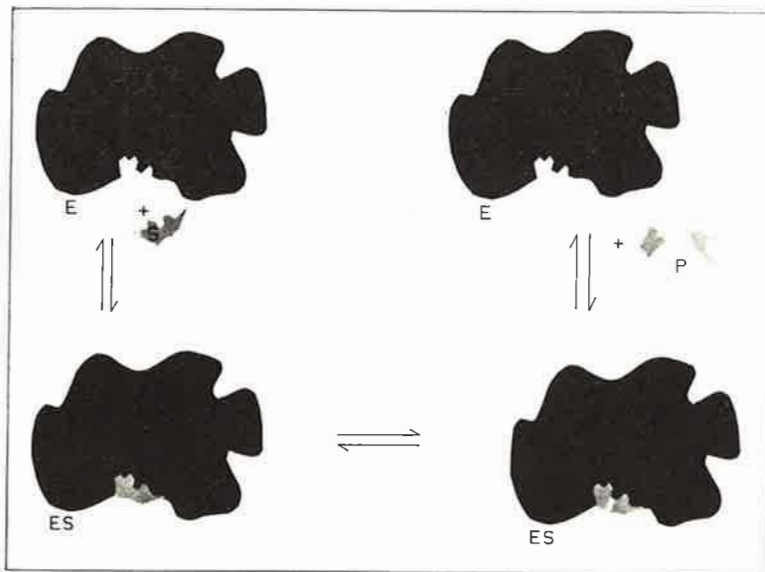
sekä aktiivisena, että inaktiivisena muotona. Inaktiivisen muodon muuttuminen aktiiviseksi ja päinvastoin on kullakin hetkellä ympäristön olosuhteiden kontrolloima. Loppujen lopuksi itse entsyymien biosynteesikin on sarja toisten entsyymien katalysoimia reaktioita. Nykyisen kaltaista elämää ei voida ajatella ilman entsyymejä.

Entsyymien tehtävänä on siis kiihdyttää reaktioita, joissa tapahtuu spesifisten kovalenttisten sidosten katkeamista tai muodostumista. Koska entsyymien poissaollessa olisi biologisten molekyylien hajoaminen mahdollista useinkin vain hyvin korkeissa lämpötiloissa, on entsyymien alennettava jollain tavoin sitä lämpötilaa, jossa tietty, entsyymin toiminnan kohteeksi joutuva sidos on labiili. Fysikokemisti sanoisi, että entsyymit alentavat aktivoitumisenergiaa. Siellä, missä spesifinen entsyymi on läsnä, ei ole mitään tehokasta kynnystä estämässä aina sellaisten yhdisteiden nopeaa muodostumista, joilla on alhaisin mahdollinen vapaa energia. Entsyymit eivät kuitenkaan vaikuta itse tasapainon luonteeseen. Ne yksinkertaisesti vain kasvattavat sitä nopeutta, jolla tasapaino saavutetaan. Miten tämä tapahtuu, ei ole vielä täysin selvitetty molekyyli-tasolla, koska minkään entsyymien kolmedimensionaalista rakennetta ei ole vielä selvitetty täydellisesti. Ei ole kuitenkaan syytä odottaa, että mitkään tähän asti tuntemattomat kemian lait olisivat entsyymitoiminnan perustana. Kuvissa 1 ja 2 on selitetty eräitä entsyymikemian peruskäsitteitä.



*Kuva 1.* Tässä kuvassa on esitetty eräitä entsyymikemian peruskäsitteitä. Yhdiste S, joka reagoi entsyymin E kanssa joko hajotakseen, liittyäkseen toiseen tai muuttaakseen rakennettaan, on substraatti. Substraatin kombi-

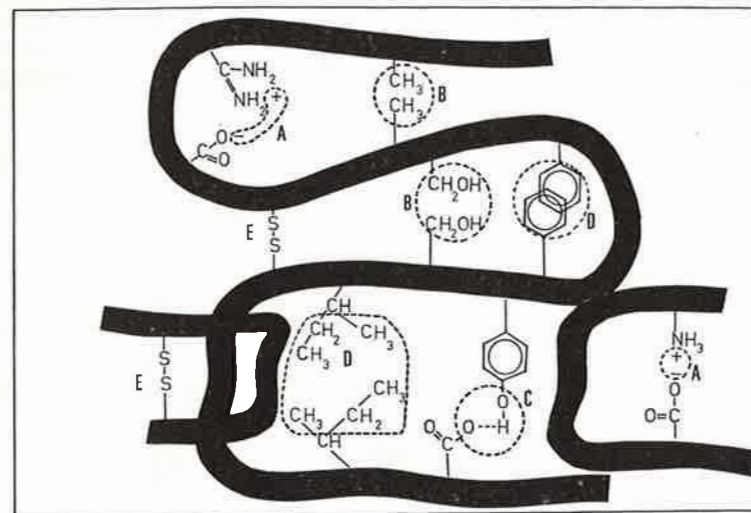
noituminen entsyymin kanssa on hyvin spesifinen prosessi, ts. kullakin entsyymillä on itselleen tyypillinen pinta, jossa on tietty aktiivinen alue, johon substraatti voi asettua. Entsyymin ja substraatin ajatellaan reagoivan keskenään tuottaen ns. entsyymisubstraattikompleksin ES, joka sitten hajoaa vapaaksi entsyymiksi ja reaktiotuotteiksi P. Toisinaan, jos substraattiväkevyys on suuri, saattaa entsyymin aktiivinen keskus sitoa kaksikin substraattimolekyyliä. Tällöin muodostuu inaktiivinen kompleksi ES<sub>2</sub>, joka ei hajoa reaktiotuotteiksi. Samanluonteinen inaktiivinen kompleksi ES syntyy entsyymin sitoutuessa jonkin inhibiittorin I kanssa, mutta entsyymireaktio voi jäädä tapahtumatta myös silloin, kun substraatti reagoi jonkin inhibiittorin kanssa. Syntynyt uusi yhdiste SI ei enää sovi aktiiviseen keskukseen. Jos entsyymi-inhibiittori muistuttaa kylliksi paljon rakenteeltaan substraattia, kilpailevat nämä molekyylit aktiivisen keskukseen sitoutumiskeskuksesta ja tuloksena on kompetitiivinen inhibiitio. Entsyymi (tai myös substraatti) voi reagoida myös aktivaattorin kanssa, jolloin katalyyysi vielä nopeutuu.



Kuva 2. Kaavamainen esitys entsyymin toiminnasta. Entsyymi reagoi aktiivisen keskoksensa välityksellä substraatin kanssa, muodostaen entsyymisubstraattikompleksin, jota usein voidaan kutsua ns. Michaelis-Menten'in entsyymisubstraattikompleksiksi. Se ei vielä ole mikään aktivoitu kompleksi. Sellainen esiintyy tapahtumasarjassa hetkeä myöhemmin ja edellistä intermediaattia paljon alhaisemmassa väkevyydessä. Michaelis-Menten'in kompleksin on ensin aktivoitettava, ennenkuin lopputuotteet vapautuvat. Oikealla alhaalla kuvattu kompleksi on jo läpikäynyt tämän aktivoitun tilan.

Ns. tertiäärinen rakenne on entsyymiproteiinien kolmedimen- sionaalinen muoto. Se on useimmissa tapauksissa hyvin sää- nötön. Säännöttömyyden aikaansaavat monet stereokemialliset syyt, mm. proliinitähteiden ja disulfidisidosten olemassaolo.

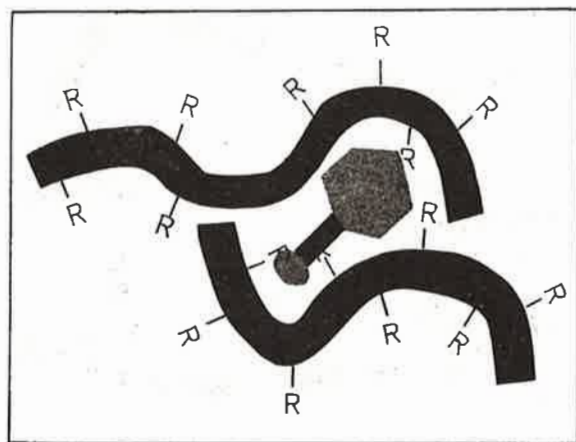
Tiedetään mm., että proliinitähteen kohdalla muodostaa poly- peptidiketju kulman. Suurin syy on kuitenkin aminohapporyh- mien erilainen kemiallinen luonne. Kukin näistä sivuryhmistä pyrkii saamaan aikaan energeettisesti suotuisampia sidosten muodostumisia (erilaisia heikkojen voimien muodostumisia) toisten ryhmien välille. Esim. tyrosiinin vapaa hydroksyyli- ryhmä pyrkii ottamaan tilan, jossa se voi muodostaa vety- sidoksen. Jos esim. hydrofobinen (vettähylkivä) isoleusiini- ryhmä on seuraava aminohappotähde, ei hydroksyyli-ryhmän vetysidoksen muodostamiskyky tule hyväksikäytetyksi ja sen suoma energia on ikäänkuin menetetty. Lisäksi useiden muiden aminohappojen sivuketjut, kuten valiinin ja leusiinin, ovat veteen hyvin vaikealiukoisia, kun taas glutamiinihapon tai lysiinin sivuketjut ovat hyvin vesiliukoisia. Siksi voi veteen hyvin liukenevan entsyymiproteiinin aminohappotähteiden si- jainti olla avaruudellisesti sellainen, että suuri osa hydrofobi- sista ryhmistä on suuntautunut molekyylin sisustaa kohti, hydrofiilisten ryhmien taas muodostaessa molekyylin pinnasta suurimman osan. Kuvassa 3 on esitetty, millaiset sidokset sta- biloivat proteiinien rakennetta.



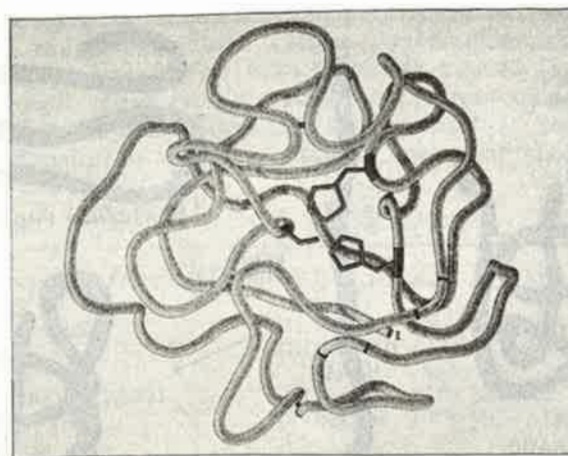
Kuva 3. Kuva esittää kaavamaisesti joitakin ei-kovalenttisia sidoksia yhdessä disulfidisidosten kanssa, jotka kaikki stabiloivat proteiinien rakennetta. A = elektrostaattisia voimia; B = van der Waalsin voimia; C = sivuketjujen karboksyyli-ryhmien ja tyrosiinitähteiden välisiä vetysidoksia; D = polaarit- tomien sivuketjujen välisiä voimia; E = disulfidisidoksia.

Näin siis jokainen aminohappotähte ensyymimolekyylissä sijaitsee tietyssä omassa kemiallisessa mikroympäristössään. Esimerkiksi pH:n, lämpötilan, tiettyjen lääkeaineiden, yleensä inhibiittorien ja aktivaattorien vaikutuksesta voi minkä tahansa aminohapposivuketjun ionisaatiossa tapahtua muutoksia. Tällainen ionisaation muutos jossakin ryhmässä vaikuttaa taas viereisten aminohapporyhmien ionisoitumiseen ja niiden kemiallisiin ominaisuuksiin. Ns. entsyymien aktiivinen keskus ei ole mitään muuta kuin ryhmä aminohappojen sivuryhmiä, jotka ovat toisiinsa nähden avaruudellisesti sellaisessa asennossa, että niiden väliin sopii yleensä vain tietyn rakenteen omaava substraatti tai substraatteja. Useinkaan eivät aminohappojen sivuryhmät ole jatkuvasti tällaisessa sopivassa avaruudellisessa asemassa, vaan joutuvat sellaiseen esim. ensyymimolekyylin muodonmuutosten avulla.

Aktiivinen keskus, joka ei ole jäykkä, vaan joustava rakennelma, muodostuu siis vain pienestä osasta polypeptidiketjuja ja käsittää vain sellaiset aminohappotähteet, jotka ovat suorassa fysikaalisessa kontaktissa substraatin kanssa tai muuten vaikuttavat läheisyydellään reaktioon. Koshlandin (2) mukaan voidaan katalyyysin kanssa tekemisissä olevat aminohapot jakaa kontaktiaminohappoihin, apuaminohappoihin ja myötävaikuttaviin aminohappoihin. Aminohappotähteiden erilaisen tehtävän perusteella katalyyysissä voidaan lisäksi puhua aktiivisen alueen sitoutumiskeskuksesta ja vaikutuskeskuksesta. Kaaviokuva minikä tahansa ensyymin aktiivisesta keskuksesta voisi olla esimerkiksi kuvassa 4 esitetyn näköinen. Kuvassa 5 on lisäksi esitetty



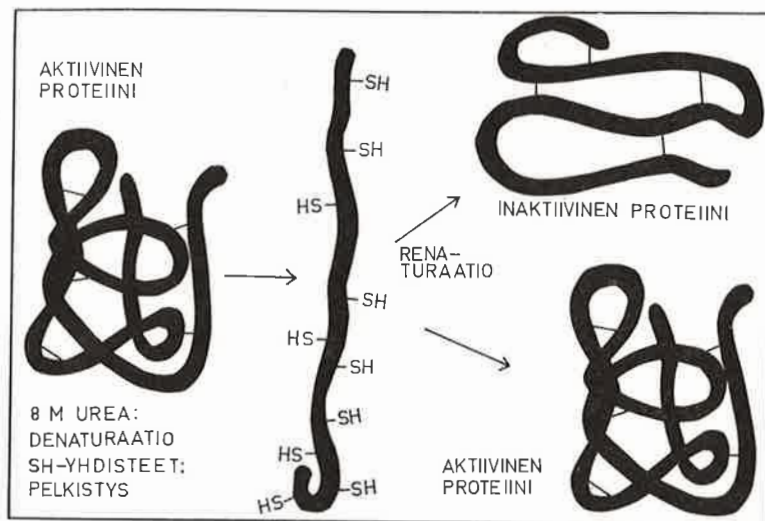
Kuva 4. Kaavamainen esitys aktiivisesta keskuksesta (2). Paksut viivat esittävät osaa ensyymin polypeptidiketjuista, joissa R:t edustavat aminohappojen sivuryhmiä. Substraatti, joka on asettunut aktiiviseen keskukseen, muuttuu aktiivisen keskuksen vaikutuksesta tässä esimerkissä keskiosastaan.



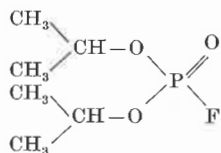
Kuva 5. Kymotrypsinogeenin molekyylin mahdollinen rakenne (3). Molekyylin koostuu 246:sta aminohappotähteestä. Kolmedimensionaalinen muoto johtuu suureksi osaksi disulfidididoksista, jotka sitovat molekyyliketjut toisiinsa. Tämä ensyymi tulee aktiiviseksi kun mustalla renkaalla (toinen vasemmalta) rajoitettu osa hydrolysoituu irti. Muut renkaat kuvaavat muita mahdollisia katkaisukohtia. Molekyylin aktiivinen keskus koostuu mahdollisesti kahdesta histidiinin imidatsolirenkaasta ja yhdestä seriinitähteestä.

kymotrypsinogeenimolekyylin mahdollinen rakenne aktiivisine keskuksineen. Loppuosaa proteiinista toimii runkona, jonka ansiosta aktiivisen keskuksen aminohappotähteillä on katalyyysiin vaadittava sopiva avaruudellinen sijainti. Tällaisen rungon tärkeys on ymmärrettävää tietäessämme millä tavalla esimerkiksi denaturoivat aineet vaikuttavat proteiinien konfiguraatioon (kuva 6). Osa ensyymimolekyulistä ei siis millään tavalla vaikuta reaktioon. Esimerkiksi sellaisista ensyymeistä kuin myosiini, enolaasi ja ribonukleasi, voidaan poistaa suuria osia ilman sanottavia muutoksia itse katalyyttisissä ominaisuuksissa.

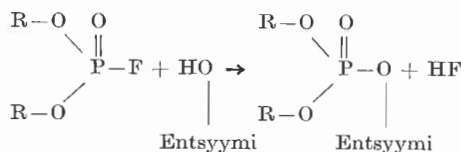
Tutkimuksissa on havaittu, että useat esteraasit ja proteinaasit, jotka lukeutuvat hydrolyyttisiin ensyymeihin, omaavat aktiivisessa keskuksessaan seriinin hydroksyyli ryhmän. Tähän tulokseen on tultu käyttämällä ns. valesubstraatteja. Ne ovat substraatteja, jotka ovat rakenteeltaan kylliksi normaalien substraattien kaltaisia voidakseen reagoida ensyymin aktiivisen keskuksen kanssa ja muodostaakseen kovalenttisia ensyymisubstraattikomplekseja, mutta kuitenkin niin paljon erilaisia, että muodostuneet intermediaatit hajoavat vain hitaasti tai ei lainkaan. Tätä aktiivisten keskusten merkitsemistä on suoritettu proteinaaseilla ja esteraaseilla eritoten diisopropylfluoro-



Kuva 6. Kaavamainen esitys disulfididisosten reaktioista proteiinien denaturaatioissa ja renaturaatioissa (4). Konsentroidut urealiuokset aikaansaavat proteiinimolekyylien denaturoitumisen, samoin kuin monet tiolit, esim. merkaptotaanoli, jotka pelkistävät -S-S- -sidoksia. Kun denaturoivat aineet poistetaan proteiiniliuoksesta, palautuu tavallisesti proteiinin alkuperäinen konfiguraatio ja aktiivisuus ilman vaikutuksesta. Vain harvoin johtaa renaturaatio kuvassa oikealla ylhäällä esitettyyn muotoon.



Diisopropylfluorofosfaatti




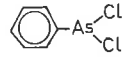
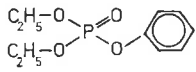
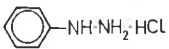
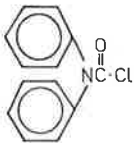
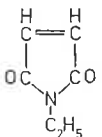
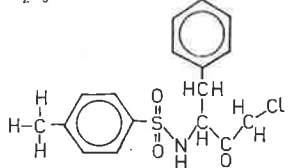
Kuva 7. Entsyymien inhiboituminen spesifisellä ryhmäreagenssilla. Diisopropylfluorofosfaatti reagoi monien esteraasien ja proteolyyttisten entsyymien aktiivisen keskuksen seriinin hydroksyyli-ryhmän kanssa, tuottaen fluorivetyä ja inaktiivisen diisopropylfosforoentsyymin (5).

fosfaattia käyttäen (kuva 7). Useat mainituista entsyymeistä reagoivat tämän reagenssin kanssa muodostaen di-isopropylfosforoentsyymin, joka on katalyyttisesti inertti. On kiinnostavaa havaita, miten monien esteraasien ja proteinaasien aktiivisen keskuksen aminohappojärjestys muistuttaa toinen toistaan juuri mainitun aktiivisen seriinintähden suhteen (kuva 8).

ENTSYYMI	JÄRJESTYS	
ALKAALINEN FOSFATAASI (E. COLI)	-THR-ASP	-SER-ALA-ALA-SER-
KYMOTRYPSIINI	-GLY-ASP	-SER-GLY-GLY-PRO-
TRYPsiINI	-GLY-ASP	-SER-GLY-PRO-VAL-
TROMBIINI	-ASP	-SER-GLY-
FOSFOGLUKOMUTAASI	-THR-ALA	-SER-HIS-ASP-
SUBTILISIINI	-GLY-THR	-SER-MET-ALA-SER-

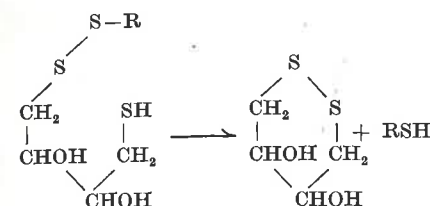
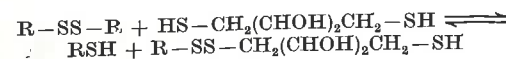
Kuva 8. Eräiden esteraasi- ja proteinaasityyppisten entsyymien aktiivisen keskuksen aminohappojärjestys (6). Kuva osoittaa, että esimerkeiksi otetuilla entsyymeillä on aktiivisessa keskuksessaan **kaikilla** yksi seriinintähde, jonka hydroksyyli-ryhmä ottaa osaa katalyysissä.

Muita aminohappotähteitä, jotka saattavat olla osana entsyymien aktiivisessa keskuksessa on histidiinin heterosyklinen imidatsoliryhmä, jonka erikoisominaisuudet johtuvat siinä olevasta sekundäärisestä "pyrroli"- ja tertiäärisestä "pyridiini"-tipestä, molemmat kojugoituneeseen rengassysteemiin liittyneinä. Myös kysteiinin sulfhydryyliryhmä on osoitettu lähellä fysiologisia pH-arvoja ja niinpä tämä ryhmä vaikuttaaakin useiden entsyymien aktiivisessa keskuksessa. Koska kaikki entsyymit eivät katalysoi kovalenttisten intermediaattien muodostumista, ei aktiivisen keskuksen merkitseminen kemiallisilla yhdisteillä aina ole mahdollista. Esim. p-hydroksimerkuribentsoaatti tai p-kloromerkuribentseenisulfonaatti reagoivat merkuroimalla SH-ryhmiä muodostaen katalyyttisesti inaktiivisia tuotteita. Useimmissa tapauksissa ei voida kuitenkaan olla varmoja siitä, että käytetty reagenssi on reagoinut juuri aktiivisen keskuksen SH-ryhmän kanssa vai entsyymirungon peptidiketjun jonkin muun SH-ryhmän kanssa. Jälkimmäisessä tapauksessa on seurauksena pieniä proteiinin muodonmuutoksia, jotka tuottavat inaktiivisen entsyymin. Suurin haitta tällaisissa tutkimuksissa onkin juuri spesifisten reagenssien puute. Siitä huolimatta voidaan tarkastella kuvaa 9, josta käy esimerkkeinä esille millaisia yhdisteitä voidaan käyttää erilaisten aminohappojen sivuryhmien toteamiseen aktiivisessa keskuksessa. Esimerkkinä entsyymien aktivoitumisesta voitaisiin taas mainita ditiotreitolin vaikutus SH-ryhmien tilan yllä-

INHIBITTORI	ENTSYYMIRYHMÄ
 <p>Na<sup>+</sup> p-KLOROMERKURIBENSOAATTI</p>	-SH [ -COOH -NH <sub>2</sub> IMIDATSOLI ]
 <p>DIKLOROFENYLARSIINI</p>	-SH
 <p>DIETYL-p-NITROFENYLFOSFAATTI</p>	-OH (SERIINISSÄ) [IMIDATSOLI]
<p>ICH<sub>2</sub>CO·NH<sub>2</sub> JODOASETAMIDI</p>	-SH [-NH <sub>2</sub> ]
 <p>FENYLHYDRATSIIINI·HCL</p>	KARBONYYLIRYHMÄT
<p>SITRAATTI OKSALAATTI SYANIDI ATSIDI</p>	METALLIT
 <p>DIFENYKARBAMYLORIDI</p>	-OH (SERIINISSÄ) IMIDATSOLI?
 <p>N-ETYLMALEIMIDI</p>	-NH <sub>2</sub> , -SH
 <p>p-TOLUENSULFONYLFENYLAANYL- KLOROMETYLKETONI</p>	IMIDATSOLI

Kuva 9. Esimerkkejä spesifisten tai vähemmän spesifisten ryhmäreagenssien käytöstä entsyymien aktiivisen keskuksen aminohapporyhmien identifioimiseksi. Kyseisen yhdisteen kanssa reagoiva kemiallinen ryhmä entsyymeissä on esitetty oikealla. Hakasuluissa esiintyvät ryhmät saattavat joissakin olosuhteissa myös reagoida ko. yhdisteen kanssa.

pitäjänä (kuva 10). Usein kuitenkin käytetään epäsuoria menetelmiä katalyyttisissä prosesseissa vaikuttavien aminohappotähteiden identifioimiseksi. Tällöin voidaan esimerkiksi vaihdella pH:n funktiona tiettyjä reaktion parametrejä, esim. maksiminopeutta tai ns. Michaelsin vakiota.

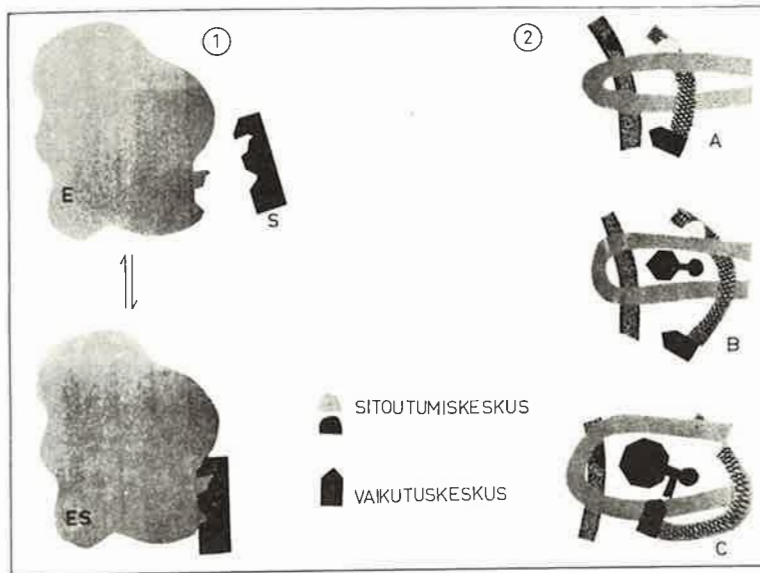


Kuva 10. Esimerkki aktivaattorin käytöstä entsyymikatalyysissä. Jos entsyymin tai sen aktiivisen keskuksen aktiivinen konfiguraatio vaatii tiettyjen sulfhydryyliryhmien läsnäoloa, voidaan esim. ditiotreitolia (2,3-dihydroksi-1,4-ditiobutaanin treoisomeeri) lisäämällä saada aikaan useimpien disulfididosten pelkistyminen SH-ryhmiksi, ts. kyseinen yhdiste aktivoi entsyymireaktiota. Ditiotreitolin reaktio disulfidin kanssa tapahtuu esitettyjen kahden reaktion tuloksena ja tapahtuu muutamien minuuttien aikana pH 8:ssa. Tällaisessa tapauksessa siis tiolilla on päinvastainen vaikutus entsyymin aktiivisuuteen kuin kuvassa 6.

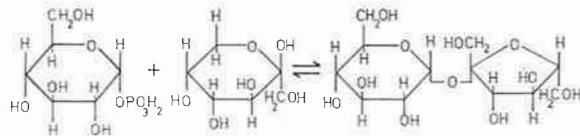
Ainoassakaan tapauksessa ei tunneta täydellisesti minkään entsyymien aktiivisen keskuksen aminohappojen kolmedimensionaalista keskinäistä asemaa. Ei ole itse asiassa lainkaan varmaa, että substraatin poissaollessa olisi aktiivisen keskuksen kolmedimensionaalinen rakenne vakio ja että se vastaisi katalyyttisesti aktiivista muotoa. Emil Fischer esitti 1800-luvun lopulla avain-lukko-hypoteesin pyrkiessään selittämään entsyymien spesifisyyttä. Tämä tarkoittaa sitä, että entsyymi esiintyy verrattain jäykän templaatin muodossa, johon substraatti sitoutuu. Koshland (2, 7, 8) on taas puhunut ns. induoidun sovittautumisteorian puolesta, joka sisältää seuraavat kolme kohtaa:

1. Substraatin sovittautuessa aktiiviseen keskukseen aiheuttaa se melkoisia muutoksia entsyymiproteiinin geometriassa.
2. Entsyymien toimiessa on katalyyttisten ryhmien keskinäinen asento lyhytaikainen ja labiili.
3. Substraatti itse aiheuttaa tällaisen sopivan ryhmien välisen keskinäisen orientoitumisen muuttamalla proteiinin geometriaa.

Näiden kahden teorian välinen ero on nähtävissä kuvassa 11. Mainittua induced-fit teoriaa ruvettiin kehittämään tarkoitukseksi selittämään useita havaintoja, joita ei voitu ymmärtää avain-lukko-hypoteesin perusteella. Ajatelkaamme esimerkiksi sukroosifosforylaasin katalysoimaa reaktiota (kuva 12).



Kuva 11. Kuva esittää avain-lukko-hypoteesin ja Koshlandin induced fit-teorian (oikealla) (2,7) eroavaisuuksia. Avain-lukko-hypoteesin mukaan on aktiivisen keskuksen rakenne jäykähkö, substraatin sopiessa siihen aivan kuin avain lukkoon. Oikealla taas esittää A natiivia entsyymiä. Kohdassa B on tietyn rakenteen omaava substraatti joko jo osittain sitoutunut tai muuten joutunut aktiiviseen keskukseseen, mutta sen molekyylikoko on vielä liian pieni, jotta se pystyisi indusoimaan, aikaansaamaan, kyllin sopivia muutoksia aktiivisen keskuksen aminohapporyhmien orientaatioissa. Kohdassa C on juuri oikea substraatti reagoinut sitoutumiskeskuksen kanssa ja aikaansaanut sellaisen tarvittavan muutoksen aktiivisen keskuksen geometriassa, että katalyyysi saattaa tapahtua.



Kuva 12. Kuva esittää glukoosi-1-fosfaatin ja fruktoosin välistä reaktiota glukosyylifruktoosiksi (sukroosi) ja päinvastoin sukroosifosforylaasin katalysoimana. Tarkempi selostus tekstissä.

Lukko-avain-hypoteesi esittää nyt, että fruktoosin ollessa poissa glukosyyli-ryhmän akseptorina, pitäisi glukoosi-1-fosfaatin ja veden reagoida keskenään huomattavassa määrässä. Glukoosi-1-fosfaatti sitoutuu entsyymiin fruktoosin poissaollessa, vettä taas on melkoisen varmasti läsnä sen lähes 55 molaarisesta väkevyy-

destä johtuen aktiivisen keskuksen lähellä ja sen pitäisi siis toimia glukosyyli-ryhmän akseptorina. Kuitenkaan mitään havaittavaa reaktiota ei veden ja glukoosi-1-fosfaatin välillä voida todeta, vaikka entsyymi olisikin läsnä. Todennäköisesti suurin selitys tälle olisi se, että fruktoosi sitoutumalla aktiiviseen keskukseseen, aiheuttaa muutoksen aktiivisen keskuksen geometriassa muodostaen katalyyttisesti aktiivisen konfiguraation. Myös monet muut havainnot viittaavat vanhan teorian riittämättömyyteen (9).

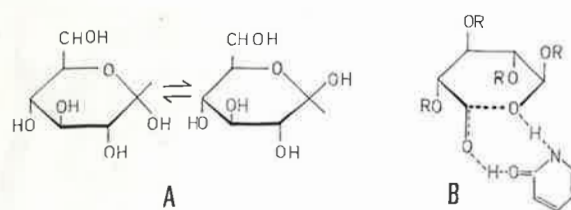
Entsyymikatalyyysien mekanisme on yritetty tutkia mallireaktioilla. Tällaisista kokeista on saatu monenlaisia mielenkiintoisia tuloksia. Ensimmäinen vaihe entsyymien katalysoimassa reaktiossahan käsittää yhden tai useamman reaktantin sitoutumisen entsyymien pinnalle. Sellainen sitoutumisprosessi herättää esille mahdollisuuden, että yksi entsyymien toimintoista onkin orientoida ja muotoilla reaktiivista aluetta siten, että katalyyysi tapahtuisi nopeasti. Sellainen katalyyysi voi sisältää ns. läheisyysvaikutuksia, ts. reaktion nopeus kasvaa yksinomaan siitä johtuen, että reaktantit joutuvat lähemmäksi toisiaan, samoin kuin myös orientaatiovaikutuksia, jotka aikaansaavat reaktioita suosivan ryhmien konfiguraation. Koshland (10) on laskenut pelkästään läheisyysvaikutusten aikaansaaman reaktionopeuden lisäyksen eri entsyymeillä ja havainnut, että parhaimmillaankin on reaktion nopeus kasvanut läheisyysvaikutuksen ansiosta vain hyvin vähän. Tämä tulos on oikeastaan seuraus siitä, että laimeissa entsyymiliuoksissa on aktiivisten keskusten konsentraatio aina hyvin alhainen. Tulokset siis osoittavat, että läheisyysvaikutukset eivät yksinään voi selittää entsyymien katalysoimien reaktioiden nopeutta. Samanlaiset laskelmat erilaisten orientaatioparametrien mukaanottamisenkin jälkeen eivät ole muuttaneet tätä käsitystä. Vaikkakin nyt on löydettävä lisätekiäjiä, on järjestistä otaksua, että mainitut vaikutukset toki jonkin verran auttavat entsyymikatalyyysiä. Paljon tyydyttävämpi entsyymireaktioiden malli olisi ehkä sellainen reaktio, jossa yksinkertaisesti vain heikkosten voimien ajatellaan sitovan substraatin katalyyttiin tai muuhun reaktantiin ennen niitä reaktioita, joissa sidokset sitten lopullisesti muuttuvat. Sellainen sitoutuminen voisi edesauttaa sidosten muuttumisreaktioita ja suovat reaktiolle jonkin verran spesifisyyttäkin.

Termiä yleinen happo- tai emäskatalyyysi käytetään reaktioista, joiden nopeus on liuoksessa olevien kaikkien happojen tai emästen konsentraation funktio paremminkin kuin juuri hydronium- tai hydroksyyli-ionien väkevyyden funktio. Yleiset happo-emäs-katalyytit näyttävät olevan tärkeitä entsyymikatalyyysissä. Useiden aminohappojen sivuryhmät ovat huo-

mattavan happamia tai emäksisiä luonteeltaan ja voivat siten toimia yleisinä happo-emäskatalyytteinä. Paremminkin juuri näitä voisi pitää katalyytteinä kuin esim. hydronium- tai hydroksyyli-ioneja, joita on liuoksessa vain pieniä määriä niissä pH-arvoissa, joissa entsyymit yleensä toimivat. Sitäpaitsi entsyymiaktiivisuuksien pH-riippuvuutta tutkittaessa havaitaan, että saadut käyrät kuvaavat usein useamman kuin yhden happaman tai emäksisen ryhmän ionisaatiota. Deuteriumilla aikaansaadut isotooppiefektit taas osoittavat, että useissa tapauksissa kyseiset vaikutukset ovat yhdenmukaisia protonin siirron kanssa juuri nopeutta rajoittavassa vaiheessa, joka onkin yleisen happo-emäskatalyyysin piirteitä.

Tässä yhteydessä herää tietenkin kysymyksiä. Ensiksikin, mitkä reaktiotyypit olisivat alttiita tällaiselle katalyyksille? Mitkä tekijät määräävät tietyn molekyylin tehokkuuden happo- tai emäskatalyyttinä? On myös ratkaistava, miten reaktion alttius happo-emäskatalyyysiin muuttuu eri komponenttien reaktiivisuuden muuttuessa. Näitä kysymyksiä voidaan tutkia yleisen happo- ja emäskatalyyysin teorian pohjalla ja käyttäen mm. Brönstedin katalyytilakia. Useimpien yleisen happo-emäskatalyyysin mekanismien selittämisessä esiintynyt epäselvyys on johtanut siihen, että sekä happo- että emäskatalyyteille voidaan ajatella jonkinlainen mekanistinen rooli. Tällöin nousee esille käsite samanaikaisesta yleisestä happo-emäskatalyyysistä, toisin sanoen useiden katalyyttisten aktiviteettien samanaikaisesta toiminnasta yhdessä ainoassa reaktiossa. Tämä olisi sopivaa entsyymireaktioita ajatellen, sillä on epätodennäköistä, ettei mikään yksi ainoa katalyyttinen aktiivisuus ole riittävä selittämään sellaisten reaktioitten suurta tehokkuutta.

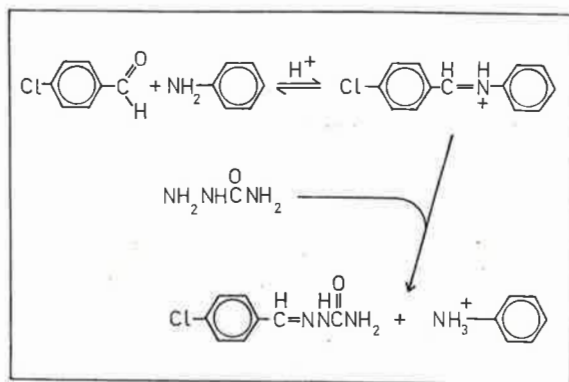
Kuvassa on esitetty tyypillinen esimerkki yleisestä happo-emäskatalyyysistä ja samanaikaisesta vastaavasta katalyyysistä. Glukoosin mutarotaatio (11) tarjoaa erinomaisen esimerkin sellaisesta reaktiosta, joka on altis yleiselle happo-emäskatalyyksille (kuva 13). Klassillinen esimerkki jälkimmäisestä tyypistä on taas tetrametyylglukoosin mutarotaatio bentseeniliuoksessa (12). Tämä reaktio tapahtuu hyvin hitaasti tai ei lainkaan bentseenissä, mutta kiihtyy huomattavasti happaman fenolin tai emäksisen pyridiinin läsnäollessa. Jos kuitenkin sekä fenoli että pyridiini ovat samanaikaisesti läsnä, on tällaisen reaktion nopeus suurempi kuin fenolin tai pyridiinin avulla erikseen saatujen reaktioiden nopeuksien summa. Tämä havainto osoittaa, että kysymyksessä on samanaikainen yleinen happo-emäskatalyyysi. Aivan kuin tämän tueksi on havaittu, että 2-pyridoni, joka omaa sekä happaman että emäksisen funktion, on erittäin tehokas katalyytti. 0.001 M 2-pyridoni on n. 7 000 kertaa tehokkaampi kuin 0.001 M fenolin ja 0.001 M pyridiinin seos,



Kuva 13. Esimerkki reaktiosta, joka on altis yleiselle happoemäskatalyyksille, on glukoosin mutarotaatio, jossa  $\alpha$ -D-glukoosin ja  $\beta$ -D-glukoosin toisikseen muuttuminen on vakio-pH:n omaavan ja 1 : 1-suhteisen etikkahappo-natrium-asetaatipuskurin väkemyyden funktio. Havaittua katalyyysiä ei voida selittää hydronium- tai hydroksyyli-ionien, vaan pikemminkin etikkahapon, asetaatin tai molempien aikaansaamaksi. Samanaikaisesta happo-emäskatalyyysistä on esimerkiksi otettu tetrametyylglukoosin mutarotaatio bentseenissä 2-pyridonin katalysoimana, jolloin muodostuvalla transiitotilalle voitaisiin ajatella kuvassa oikealla esitettyä rakennetta.

huolimatta siitä, että 2-pyridoni on heikompi happo kuin fenoli ja heikompi emäs kuin pyridiini. Muodostuvalla intermediaattilla on mahdollisesti kuvassa 13 oikealla esitetty rakenne. Yksi tärkeä seikka kuitenkin tekee kyseisen mekanismin suoran vertaamisen entsyymien katalysoimaan reaktioon mahdottomaksi. Mainittu mutarotaatio tapahtuu nopeasti bentseenissä, jolla on vain mitättömiä happo-emäsominaisuuksia, mutta ei vedessä, jolla taas on huomattavia happo-emäsominaisuuksia. Koska samanaikaisen katalyyysin merkitystä ei vedessä tapahtuville reaktioille ole vielä täysin kyetty selvittämään, jää myös niiden osuus entsyymikatalyyysissä toistaiseksi spekulatioiden, tosin monella tavalla perusteltujenkin spekulatioiden varaan.

Päinvastoin kuin yleinen happo-emäskatalyyysi, edellyttää taas ns. kovalenttikatalyyysi kovalenttisesti sidottujen entsyymisubstraatti-intermediaattien muodostumista. Suuren osan entsyymireaktioista tiedetään käsittävän tällaisten intermediaattien muodostumisen. Eräs tällainen katalyyesityyppi on nukleoofiilinen katalyyysi. Esimerkkinä tällaisesta mainittakoon semikarbatsonin muodostuminen p-klorobentsaldehydistä aniliinin katalysoimana (kuva 14). Entsyymireaktioihin tämä esimerkki liittyy siten, että semikarbatsonin muodostuminen pyridoksaalifosfaatista ja pyridoksaalista on altis nukleoofiiliselle katalyyksille sekä primääristen, että sekundääristen amiinien toimesta (13). Pyridoksaalifosfaatista riippuvaiset entsyymit sisältävät tämän koentsyymin sitoutuneena lysiinin epsilon-aminoryhmään

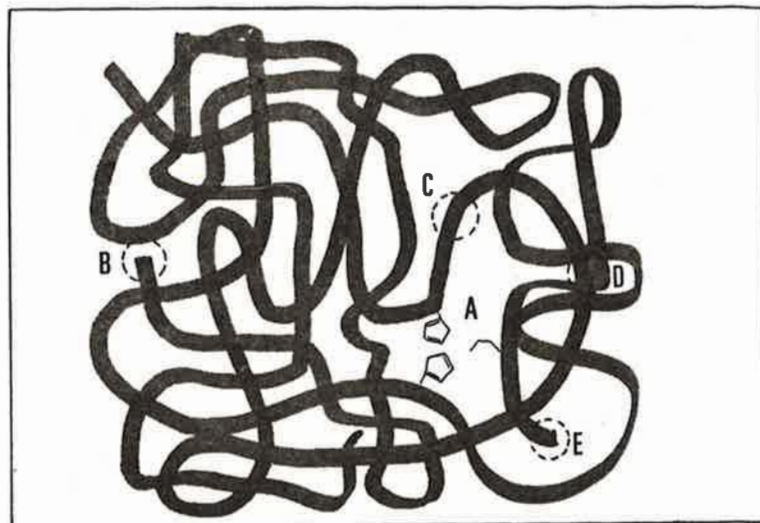


Kuva 14. Esimerkki nukleofiilisestä katalyysistä: semikarbatsonin muodostuminen p-klorobentsaldehydistä aniliinin katalysoimana. Aldehydin ja aniliinin välillä muodostuu ensin Schiffin emäs. Tätä seuraa semikarbatsonin nopea vaikutus Schiffin emäkseen. Schiffin emäs reagoi erittäin tehokkaasti tällaisissa tapauksissa, koska se protonoituu helposti, tuottaen hyvin reaktiivisen kationin.

muodostaen ns. Schiffin emäksen. Koska pyridoksaalifosfaatin reaktiot edellyttävät Schiffin emäksen muodostumista aminohappojen kanssa, on entsyymille edullista omata koentsyymi, joka on sitoutunut Schiffin emäksen muodossa.

Vielä eräs esitetty entsyymiteoria edellyttää, että entsyymien katalysoimien reaktioitten nopeus ainakin osittain aiheutuisi eräänlaisen jännityksen muodostumisesta substraatin siihen osaan, jossa tapahtuu sidosten muuttumisia. Entsyymin ja substraatin väliset sidosvoimat tulisivat käytetyksi hyväksi siten, että ne indusoivat eräänlaista vääntymistä substraatissa. Tämä teoria on eräs mielenkiintoisimmista ja voi olla selityksenä entsyymireaktioitten suurelle nopeudelle. Esim. syklinen yhdiste etyleenifosfaatti hydrolysoituu  $10^8$  kertaa nopeammin kuin vastaava ei-syklinen yhdiste. Toisaalta onkin sitten todettu etyleenifosfaatissa tiettyä rengasjännitystä.

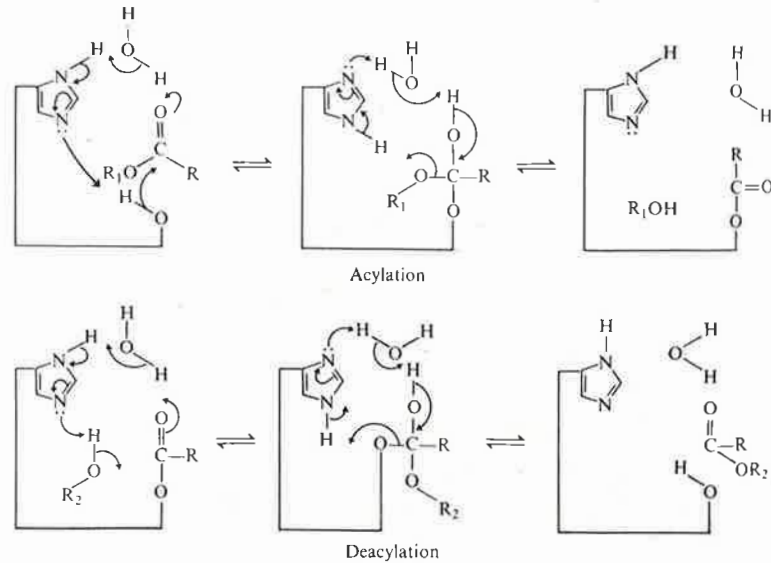
Ennen kuin siirrytään tarkastelemaan vielä paria esimerkkiä aktiivisen keskuksen toiminnasta, on mainittava Jacobin, Monodin ja Changeuxin hypoteesista, joka esittää, että entsyymien katalyyttisiä ominaisuuksia kontrolloivat erilaiset pienet molekyylit (kuva 15). Nämä voivat vaikuttaa ei vain suoraan aktiiviseen keskukseseen, vaan myös epäsuorasti muualla proteiinimolekyylissä, ns. allosteerisiin keskuksiin (14, 15, 16).



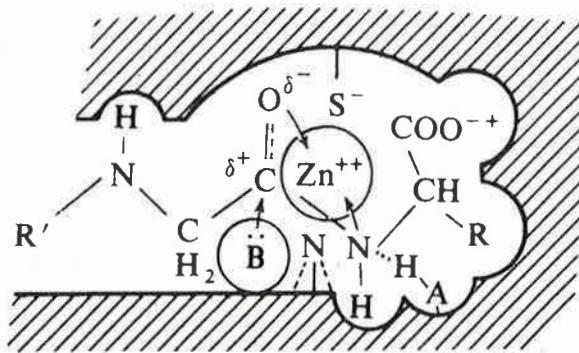
Kuva 15. Kaavamainen esimerkki allosteriasta. Kuvattu entsyymimolekyylä koostuu tässä tapauksessa kahdesta identtisestä monomeeristä (protomeeristä), jolloin itse molekyylä voidaan kutsua oligomeeriksi. A on aktiivinen keskus, joka kuuluu yhteisesti kumpaakin monomeeriin. C ja D ja toisaalta B ja E esittävät allosteerisia vaikutuskeskuksia. Näihin keskuksiin voivat tietyt pienet molekyylit sitoutua ja vaikuttaa aktiivisen keskuksen affiniteettiin substraattiin nähden tai itse siihen entsyymisubstraattikompleksin muodostumisen jälkeiseen reaktioon, jossa substraatti muuttuu. Nämä allosteeriset yhdisteet ovat usein täysin toisenlaisia rakenteeltaan kuin substraatti, mutta muistuttavat sen sijaan usein tärkeiden aineenvaihduntareaktiosarjojen loppu- tuotteita, tai muita tärkeitä tuotteita, jotka siis kontrolloivat entsyymien toimintaa.

Tämän tyyppinen vaikutus voidaan erottaa tavallisemmasta tällaisten aineiden suorasta vaikutuksesta (aktivaattorit ja inhibiittorit). Kuvissa 16 ja 17 on esitetty kaksi esimerkkiä aktiivisen keskuksen toiminnasta kymotrypsinillä (17, 18) ja karboksipeptidaasi A:lla (19).

Tällainen aktiivisen keskuksen kuvaaminen on epäilemättä liiaksi yksinkertaistettua ja sitä käytettäessä on muistettava muiden mahdollisten ko-operatiivisten vaikutusten olemassaolo. On luultavasti hyödytöntä esittää pidemmälle meneviä malleja entsyymien toiminnasta ennen kuin tiedetään enemmän entsyymiproteiinien sekundäärisestä ja tertiäärisestä rakenteesta.



Kuva 16. Asyyliiryhmän siirron mahdollinen mekanismi kymotrypsiinin katalysoimassa reaktiossa (17, 18). Ensimmäisessä vaiheessa esteri on joutunut aktiiviseen keskukseen, jossa seriin hydroksyyliiryhmä vaikuttaa nukleoofiilisesti substraatin karbonyyliiryhmän hiiliatomiin (nukleoofiilinen ryhmä on reaktiivinen ryhmä, jolla on liikaa elektroneja ja jotka se pyrkii luovuttamaan pois). Tätä hydroksyyliiryhmän vaikutusta ikäänkuin tukee vielä histidiinin imidatsoliryhmä aiheuttamansa yleisen happoemäskatalyyysin avulla, jolloin vesimolekyyli toimii hapon katalysoiman reaktio-osan protonin siirtäjänä. Kolmannessa vaiheessa esteri on hajonnut ja asyylientsyymi muodostunut. Tämän intermediaatin deasylaatio tapahtuu myös mahdollisesti happoemäskatalyyysin avulla, jolloin vesimolekyyli toimii nyt emäskatalyyssissä protonin siirtäjänä. Deasylaatio tapahtuu siis täysin päinvastaisessa järjestyksessä kuin asylaatio.



Kuva 17. Kaavamainen esitys karboksipeptidaasi A:n aktiivisesta keskuksesta Vallee'n et al. mukaan (19). Karboksipeptidaasi A katalysoi yleensä peptidyyli-L-aminohappojen hydrolyysiä peptidiksi ja L-aminohapoksi siten,

että peptidiketju katkeaa C-terminaalista päästä. Kyseinen entsyymi on sinkkiproteiini, jonka aktiiviseen keskukseen substraatti sitoutuu oman karboksyyliiryhmänsä ja entsyymiproteiinin positiivisesti varautuneen ryhmän ionisen vuorovaikutuksen tuloksena. Substraatin R-tähde on taas vuorovaikutuksessa proteiinin hydrofobisen alueen kanssa. Lisäksi muodostuu entsyymien hapan AH-ryhmän kautta vetysidos peptidisidoksen typpi-atomiin. AH ottaa itse osaa katalyyysiin luovuttamalla protonin peptidisidoksen typpelle substraatin ollessa jossain siirtymätilassa. Tällä tavoin sitoutuu substraatti kolmesta kohdasta karboksipeptidaasi A:n aktiiviseen keskukseen. Nukleoofiilinen ryhmä B aloittaa mahdollisesti hydrolyysin luovuttamalla parin elektroneja karbonyylihiilelle, jolloin muodostuu asyylientsyymi-intermediaatti.

### Kirjallisuus

1. *Florkin, M. ja Stotz, E. H.* (toim.), "Comprehensive Biochemistry", vol. 13. Elsevier Publishing, Amsterdam 1965.
2. *Koshland, D. E. Jr.*, *Advanc. Enzymol.* **22**, 45 (1960).
3. *Neurath, H.*, *Scientific American*, **211**, 68 (1964).
4. *Watson, J. D.*, "Molecular Biology of the Gene", s. 177, W. A. Benjamin, Inc., New York 1965.
5. *Jansen, E. F., Nutting, F., ja Balls, A. K.*, *J. Biol. Chem.*, **179**, 201 (1949).
6. *Goodwin, T. W., Harris, J. I., ja Hartley, E. S.* (toim.), "Structure and Activity of Enzymes", Academic Press, New York (1964).
7. *Fasold, H., Gröschel-Stewart, U., Gundlach, G., ja Turba, F.*, "Mechanismen Enzymatischer Reaktionen" (14. Colloquium der Gesellschaft für physiologische Chemie, April 1963, Mosbach/Baden), s. 83. Springer Verlag, Berlin 1964.
8. *Koshland, D. E., Jr.*, "The Enzymes", (*Boyer, P. D., Lardy, H., ja Myrbäck, K.* toim.), vol. 1, s. 305. Academic Press, New York, 1959.
9. *Yankeelov, J. A., Jr., ja Koshland, D. E., Jr.*, *J. Biol. Chem.* **240**, 1593 (1965).
10. *Koshland, D. E., Jr.*, *J. Cell. Comp. Physiol.*, **47**, Suppl. 1, 217 (1956).
11. *Fieser, L. F., ja Fieser, M.*, "Advanced Organic Chemistry", s. 930. Reinhold Publishing Corporation, New York 1961.
12. *Swain, C. G., ja Brown, J. F., Jr.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 2534, 2538 (1952).
13. *Cordes, E. H. ja Jencks, W. P.*, *Biochemistry*, **1**, 773 (1962).
14. *Jacob, F. ja Monod, J.*, *J. Mol. Biol.*, **3**, 318 (1961).
15. *Umbarger, H. E.*, "Control Mechanisms in Cellular Processes" (*Bower, D. M.*, toim.), s. 67, The Ronald Press, New York, 1961.
16. *Stadtman, E. R.*, *Advanc. Enzymol.*, **28**, 41 (1966).
17. *Mahler, H. R., ja Cordes, E. H.*, "Biological Chemistry", s. 312, Harper & Row, New York 1966.
18. *Bender, M. L.*, "Mechanismen Enzymatischer Reaktionen" (14. Colloquium der Gesellschaft für physiologische Chemie, April 1963, Mosbach/Baden), s. 83. Springer Verlag, Berlin 1964.
19. *Vallee, B. L., Riordan, J. F. ja Coleman, J. E.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **49**, 109 (1963).

## Om enzyms intracellulära lokalisation\*

Nils-Erik Saris

*Institutionen för Klinisk Kemi, Helsingfors Universitet*

I ett ljusmikroskop ser en cell såsom leverns parenkymcell ut som en något kantig påse med en kropp, cellkärnan som simmar omkring i en vätska, cytoplasmat. Med lämpliga färgningsmetoder kan man urskilja, om än med svårighet, nukleolen i kärnan som en optiskt tätare sfärisk kropp samt mitokondrierna i cytoplasmat. I en del celler kan man urskilja Golgi-apparaten i närheten av kärnan, samt diverse korn och vakuoler. Det hela omslutes av plasmamembranen, som visserligen inte kan ses, men som ändå måste finnas där för ett skydd, som möjliggör, att cellens innehåll kan ha en helt annan sammansättning än den extracellulära lösningen. Så är ju hos däggdjuren cellerna rika på kalium, magnesium och ortofostat, medan den extracellulära vätskan innehåller främst jonerna natrium, klorid och kalcium.

Elektronmikroskopin har helt revolutionerat vår uppfattning om cellen. Uppdelningen av cellen i kärna och cytoplasma verkar irrelevant. Cytoplasmat är ingen egentlig vätska utan ett konglomerat av strukturer, som vi kan kalla organeller. Dessa är uppbyggda av membraner, som ser rätt lika ut från organell till organell och från cell till cell. Membranen ser ut att bestå av flere skikt, två täta skikt med ett elektronoptiskt ljusare skikt emellan. Med lämpliga fixeringsmetoder kan man i en del membraner se kornigheter som ett tecken på att skikten inte är homogena utan har mosaikstruktur.

Cytoplasmatets membransystem bildar ett invecklat mönster av små påsar, rör, lameller och korn, bild 1. De kan bilda rätt olika mönster i olika slags celler och har väl också olika funktioner. Trots olikheterna kan man ofta känna igen vissa organeller i helt olika celler. Mitokondrierna kännetecknas av en yttre dubbelmembran och en inre, som är veckad till tvärbalkar, cristae mitochondriales. Deras yttre membran kan ibland ses fortsätta som en del av det allmänna nätverket av

\* Föredrag vid Kemidagarnas symposium i klinisk biokemi i Helsingfors den 26. 10. 67.

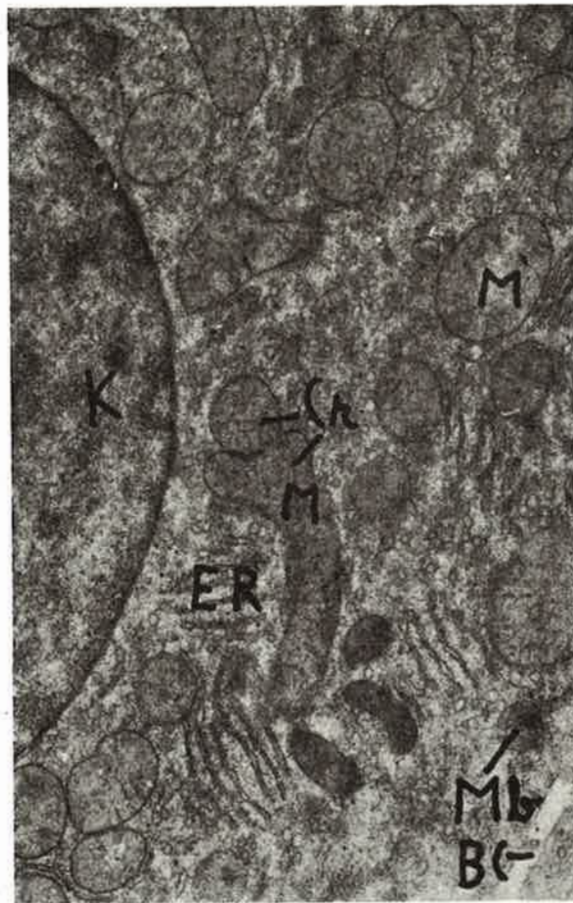


Bild 1. Elektronmikroskopbild av en del av en leverparenkymcell av råtta. Förstoring 13.500 X. Tagen av med.kand. R. Grönberg, Laboratoriet för Elektronmikroskopi vid Helsingfors Universitet. K = kärna, M = mitokondrier, Cr = cristae mitochondriales, ER = endoplasmatiskt retikulum, Mb = micro body, BC = troligen biliära canaliculi.

rör och lameller, som genomkorsar och fyller cytoplasmat, endoplasmic reticulum. I andra bilder kan man finna ställen, där cellens yttre membran, plasmamembranen, eller den kärnan omgivande membranen, kärnmembranen, bildar ett kontinuum med endoplasmic reticulum. Endoplasmic reticulum bildar stackar av lameller i Golgi-apparaten, som har en funktion som en förpackare av proteiner för exkretion, och som troligen ger upphov till en del av cellens organeller. Ställvis är endoplasmic

reticulumlamellerna och -rören besatta med små korn, ribosomer, som också kan ses fria. Det kornbesatta endoplasmic reticulum kallas rough, medan dess släta delar kallas smooth. Av övriga organeller kan nämnas lysosomerna, som ser ut som enkla påsar, medan microbodies synes ha ett fast innehåll. För en närmare beskrivning hänvisas läsaren till Porter och Bonnevilles bok (1). En schematisk framställning av cellens struktur ger bild 2.

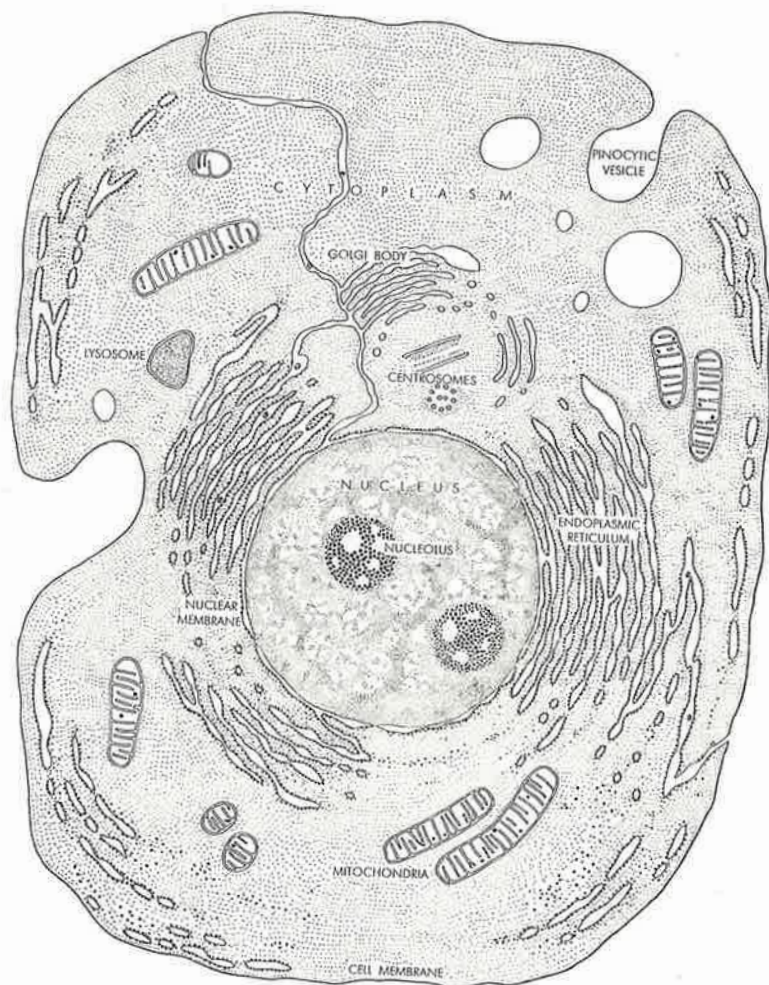


Bild 2. Schematisk bild av en "typisk" cell. J. Brachet, Sci Am. 205 Nr 3, 51 (1961).

De olika organellerna har kunnat tillskrivas olika funktioner, se Mahlers och Cordes' lärobok (2). I kärnan sker syntes av DNA, RNA, NAD\* och vissa proteiner såsom histoner. Mitokondrierna oxiderar många ämnen inklusive fettsyror, pyruvat, aminosyror och aminer, de innehåller Krebs trikarbonsyre-cykelmaskineri, men de katalyserar också synteser, såsom en stor del av stegen i urinämnes- och heminsynteserna. De tillvaratar en del av oxidationsenergin under bildning av ATP, som kan utnyttjas för energikrävande reaktioner annorstädes i cellen. Ribosomerna hjälper till med att syntetisera proteiner. Endoplasmic reticulum är sätet för syntes av mukopolysackarider, glukuronider, fosfolipider, triglycerider och kolesterol. Hydroxyleringsreaktioner är också lokaliserade till dem. Lysosomerna har specialiserat sig på hydrolytiska reaktioner av olika slag (se 3) i synnerhet i sur miljö (nedbrytning av nukleinsyror, proteiner, polysackarider). De har tillskrivits en roll vid inflammationsprocesser och autolys (3), men frågan är ännu omstridd (4). Microbodies har specialiserat sig på väteperoxidproduktion via syrekopplade dehydrogenaser.

Att de olika organellerna har olika funktioner, innebär, att de har olika enzymuppsättningar. Forskningen utnyttjar två huvudmetoder för utredandet av dessa förhållanden. Den ena är den histokemiska, den andra cellhomogenisering följt av fraktionering av organeller, varefter de kan studeras med sedvanliga enzymologiska metoder (5). Vid den histokemiska lokaliseringen utnyttjas någon utfällningsreaktion för att binda produkten vid en enzymatisk reaktion vid bildningsstället. Metodens begränsning är att enzymet eller reaktionsprodukten ifråga kan ha hunnit diffundera före utfällningen. Metoden har främst använts för att studera mitokondriella system. En synnerligen elegant utveckling är kombinerad av utfällning med elektronmikroskopi. En sådan metod har använts för att lokalisera fosfatfrigörande reaktioner såsom ATP hydrolys och fosfatasreaktioner genom utfällandet av fosfatet med bly, men även esteraser och dehydrogenaser har kunnat lokaliseras (6).

Vid cellhomogenisering frigörs intakta och söndrade cellorganeller såsom mitokondrier, cellkärnor, lysosomer och microbodies. Plasmamembranen, kärnmembranen och endoplasmic reticulum fragmenteras och bildar spontant små påsar, mikrosomer. Homogeniseringen utförs i isoton lösning, vanligen en

\* Använda förkortningar

- ATP = Adenosintrifosfat
- DNA = Deoxyribonukleinsyra
- NAD = Nikotinsyre amidadenindinukleotid
- RNA = Ribonukleinsyra

sackaros lösning. Genom centrifugering kan partiklar med olika sedimentationshastighet erhållas och membranerna fraktioneras på basen av skillnader i partikelstorlek och täthet. På detta sätt har det varit möjligt att erhålla förhållandevis rena preparat av cellkärnor, mitokondrier, lysosomer och ribosomer, medan huvuddelen av mikrosomfraktionen utgör en blandning av membranfragment, som inte direkt kan identifieras med i intakta celler observerade strukturer. Sedan alla membranfragment avlägsnats, återstår en lösning, supernatant, som innehåller lösliga enzymer.

Tabell 1 ger ett sammandrag av ämnen eller enzymer, som har befunnits knutna till en bestämd organelltyp i så hög grad, att de kan användas som "marker" för organellen ifråga. Cytokromoxidas, t.ex., förekommer anrikat i mitokondrier (omkring 60 % av totalaktiviteten i råttlever), medan lysosomfraktionen innehåller närmare 20 % (kontaminering med mitokondrier?), och kärnfraktionen omkring 10 % (2). Utom svårigheten att erhålla homogena fraktioner samt att identifiera fraktionerna med strukturer i intakta celler, vidlåder homogeniserings- och fraktioneringsmetoden den svagheten, att ett enzym kan ha lossnat ur en organell och fastnat på en annan membranfraktion. Vävnader innehåller vanligen flere celltyper, efter homogenisering kan man ej avgöra från vilken celltyp en aktivitet härstammar.

Tabell 1. Lämpliga "marker" ämnen eller enzymer för cellorganeller.

Organell	Marker
Kärna	DNA, NAD-pyrofosforylas
Mitokondrier	Suckinatdehydrogenas, cytokromoxidas
Reticulum	
rough	Glukos-6-P-as
smooth	DT diaforas
Lysosomer	surt fosfatas
Micro body	uratoxidias
Lösliga enzymer	laktatdehydrogenas

De lösliga enzymernas lokalisering är ännu vanskligare än de membranbundnas. Det finns ingen skarp gräns mellan membranbundna och lösliga enzymer, en del kan förekomma i båda formerna så, att det förekommer en jämvikt mellan den bundna och den fria formen. Vid betraktandet av bild 2, är det klart, att det förekommer många mer eller mindre avskilda vätskefaser eller compartments, som blandas vid homogeniseringen

och därefter är det omöjligt att avgöra, från vilken fas en aktivitet stammar. Dessa compartments är: den cytoplasmatiske lösningen eller matrix, den av cytoplasmic reticulum omslutna vätskan eller det intracisternala rummet, det nukleära rummet, samt av påsformiga membraner omslutna rum såsom intralysosomal, -vesikulära och -mitokondriölära rum.

I tabell 2 har sammanförts vissa kliniskt intressanta enzymer intracellulära lokalisering. Det är naturligt, att de flesta tillhör den lösliga kategorin, dit ju alla glykolytiska enzymer och en stor del av dehydrogenaserna hör. En del är s.k. exkretionsenzymer, såsom ribonukleas, amylas, lipas, vilka bildas av pankreasceller. Lagg märke till, att surt fosfatas är ett lysosomalt enzym, medan alkaliskt fosfatas är ett mikrosomalt enzym, som anrikas förekommer i bl.a. cellmembranen (ett löst ATPas?). En del enzymer förekommer både i den lösliga fraktionen och i membranfraktionen. Så är fallet med aspartataminotransferas (GOT), som finns i mitokondrier och i löslig form. Enligt Hassinens undersökningar erhålles den högsta specifika aktiviteten för detta enzym i plasmamembranfraktionen (7).

Tabell 2. Den intracellulära lokaliseringen för en del enzymer av kliniskt intresse.

Enzym	Lokalisation
Lipas	Pancreas zymogengranula
Amylas	" "
Ribonukleas	" "
Surt fosfatas	Lysosomer
Alkaliskt fosfatas	Mikrosomer, plasmamembran
Aspartat aminotransferas	Mitokondrier, plasmamembran, löslig
Glutamatdehydrogenas	Mitokondrier
Alanin aminotransferas	Löslig
Kolinesteras	Mikrosomer, plasmamembran
Sorbitdehydrogenas	Löslig
Ornitin-karbamyl-transferas	"
Aldolas	"
Glukos-6-P-dehydrogenas	"
Laktatdehydrogenas	"
Kreatinkinias	"

Studiet av enzymernas intracellulära lokalisering har öppnat ett nytt fält i livsvetenskaperna. Inom medicinen har man nu möjligheten att undersöka sjukdomar, som beror på störningar i cellorganellernas funktioner. Tolkningen av förändringar i blodets enzymaktiviteter underlättas då man vet både från vilket organ och också från vilken celldel en aktivitet stammar.

### Litteratur

1. Porter, K. R. & Bonneville, M. A.: "An Introduction to the Fine Structure of Cells and Tissues", Lea and Febiger, Philadelphia, 1964.
2. Mahler, H. R. & Cordes, E. H.: "Biological Chemistry", Harper & Row, New York, 1966.
3. DeDuve, C. in DeReuck, V. S. & Cameron, M. P. (Ed.): "Lysosomes", Ciba Foundation Symposium, Little, Brown & Co, Boston 1963, s. 1.
4. Ericsson, J. L. E., Biberfeld, P. & Seljelid, R.: Acta pathol. & microbiol. scand. **70**, 215 (1967).
6. Barka, T. & Anderson, P. J.: "Histochemistry", Harper & Row, New York 1963.
5. Bücher, Th. & Klingenberg, M. Angew. Chemie **70**, 552, (1958).
7. Hassinen, I.: Ann. Med. exp. Fenn., **45** 35 (1967).

## Plasman entsyymiaktiivisuuksien dynamiikka\*

P. Rintola

Helsingin yliopistollinen keskussairaala, Helsinki

Entsyymien synteesi ja toiminta tapahtuu solun sisällä, mutta plasmasta voidaan silti määrittää useiden eri entsyymien aktiivisuuksia. Vain harvat niistä toimivat tässä ympäristössä reaktion katalysoijina.

Entsyymejä siirtyy jo fysiologisissakin olosuhteissa soluista ekstrasellulaaritilaan ja plasmaan, jossa ne metaboloituvat muiden plasman proteiinien tavoin, noudattaen vakiohäviämisenopeutta. Kun jokaisen entsyymien aktiviteetti normaalioloissa pysyy melkein vakiona, pitää sekä entsyymien vuotamis- että häviämisenopeuksien olla yhtä suuret. Jokaisella entsyymillä on oma ns. turn-over aikansa, joka kuvaa sen vaihtumisnopeutta plasmassa.

Patologisissa tiloissa toinen tai molemmat näistä entsyymien tasoa säätelevistä tekijöistä saattavat muuttua. Tämä merkitsee muutosta plasman entsyymien määrässä (aktiviteetissa) (1.).

Plasman lukuisista entsyymeistä vain hieman alle 20 on kliinisesti merkittäviä. Se, että lukumäärä supistuu näin pieneksi, johtuu niistä vaatimuksista, joita tällaisille entsyymeille asetetaan. Niiden tulisi lähinnä antaa taudin diagnostiikassa tietoja sairauden laadusta ja vaiheesta. Seuraavassa tarkastellaan niitä tekijöitä, jotka aikaansaavat muutoksia plasman entsyymiaktiivisuuksissa.

### Entsyymien alkuperä

Ennen varsinaiseen aiheeseen siirtymistä on syytä selvittää, mistä kehon eri elimistä tai soluista plasman entsyymit ovat peräisin, ja millaisia entsyymejä plasmassa esiintyy. Tämän perusteella entsyymit voidaan jakaa kolmeen ryhmään:

1. Entsyymit, joilla on funktionaalinen tehtävä plasmassa. Tähän ryhmään kuuluvat maksassa syntetisoituvat veren hyytymistapahtumaan osallistuvat entsyymit ja tekijät (esim. plasminogeeni-plasmiini ja protrombiini-trombiini).

\* Esitelmä Kemian Päivien klinisen biokemian symposiumissa Helsingissä 26. 10. 67.

2. Entsyymit, jotka ovat jonkin spesifisen elimen aktiivisesti erittämiä entsyymiproteiineja, joilla ei ole merkitystä reaktion katalysaattorina plasmassa (esim. maksaperäinen alkalinen fosfataasi).

3. Entsyymit, joiden tehtävänä on ylläpitää elävälle solulle tärkeitä reaktioita. Mm. kaikki glykolyysiin ja sitruunahapposykliin osallistuvat entsyymit kuuluvat tähän suureen ns. soluentsyymien ryhmään.

#### *Entsyymien vuotaminen verenkiertoon*

Vaikka solumembraani on melko tiivis rakennelma, entsyymejä pääsee kalvon läpi jo normaaliolosuhteissakin. Entsyymien normaalitaso vuodon osalta määräytyy siten 1) entsyymien tiikkumisesta elävän solukalvon läpi sekä 2) solujen normaalin biologisen hajoamisen jälkeen plasmassa vuotavista entsyymeistä.

Patologisissa tiloissa membraanin permeabiliteetti muuttuu. Koska patologisia tiloja aiheuttavien tekijöiden lukumäärä on sangan suuri, ja koska eri tekijöiden osuus on kovin vaihteleva eri tautitiloissa, on vaikea tehdä mitään yleiskaaviota siitä, mikä tai mitkä tekijät kulloinkin ovat dominoivia.

Kun jonkin infektioaudin aiheuttava bakteeri tai parasiitti on päässyt tunkeutumaan kehoon, se pesiytyy elimistön solukoon, alkaen elää isäntäsolun kustannuksella. Se pyrkii monellakin eri tavalla ottamaan ravintoa isäntäsolusta, vaurioittamalla solun membraania tai aiheuttamalla muutoksia sen metaboliassa. Mm. bakteerien proteolyttiset entsyymit voivat suoraan vaikuttaa membraanin proteiineihin, muuttaen siten kalvon permeabiliteettia. Eräät bakteerit erittävät toksisia aineita, joiden vaikutus voi olla joko paikallinen tai laajempi, toksisen aineen levitessä verenkierron mukana. Esim. jäykkäkouristuksen aiheuttaja, *Clostridium tetani* levittää erittämänsä ekso-toksiinia kaikkialle verenkierron mukana.

Virusinfektiossa taudin aiheuttama virus tunkeutuu solun sisään, jakaantuen siellä. Samalla se on isäntäsolun metabolialle haitallinen tekijä, joka aiheuttaa muutoksia solun energian tuotossa, nukleiinihappo- ja proteiinisynteesissä sekä solukalvon permeabiliteetissa.

Monet yhdisteet entsyymien inhibiittoreina aiheuttavat membraanin permeabiliteetti muutoksia, jotka lopulta johtavat solun tuhoutumiseen. Esim. hiilitetrakloridi (inhiboi oksidatiivista fosforylaatiota) saa aikaan vaurioita maksakudoksessa, jotka vauriot ovat suorassa suhteessa annettuun  $\text{CCl}_4$ -määrään. Tämä korrelaatio havaitaan maksatyypipisten entsyymien aktiivisuuksien nousuna plasmassa.

Runsaasti hydrolyyttisiä entsyymejä sisältävät solupartikkelit, lysosomit liittyvät monellakin eri tavalla solun hajoamistapahtumaan. Kun solu vaurioituu, lysosomien lipoproteiini-kalvo hajoaa ja aktiiviset entsyymit pääsevät sekä sytoplasmiaan että solun ulkopuolelle, ekstraselulaaritalaan ja plasmiaan. Näyttää siltä, että lysosomien hajoaminen voi olla myös primäärinen tapahtuma, joka panee solun hajoamisen alulle (lysosomien hydrolaasit hajoittavat solun kaikkia aineosia).

Oman patologisen ryhmän muodostavat immunisaatiosta ja autoimmunisatiosta johtuvat soluvauriot. Kudosantibodit, joiden syntymekanismeihin ei tässä yhteydessä puututa, kiinnittyvät solujen pintaan, aiheuttaen solujen hajoamisen. Hajoamismekanismia ei tarkoin tunneta, mutta tapahtumaan oletetaan liittyvän antibodien lisäksi punasolujen hemolyyssissä paremmin tunnettujen komplementti-tekijöiden (C'-komponentit).

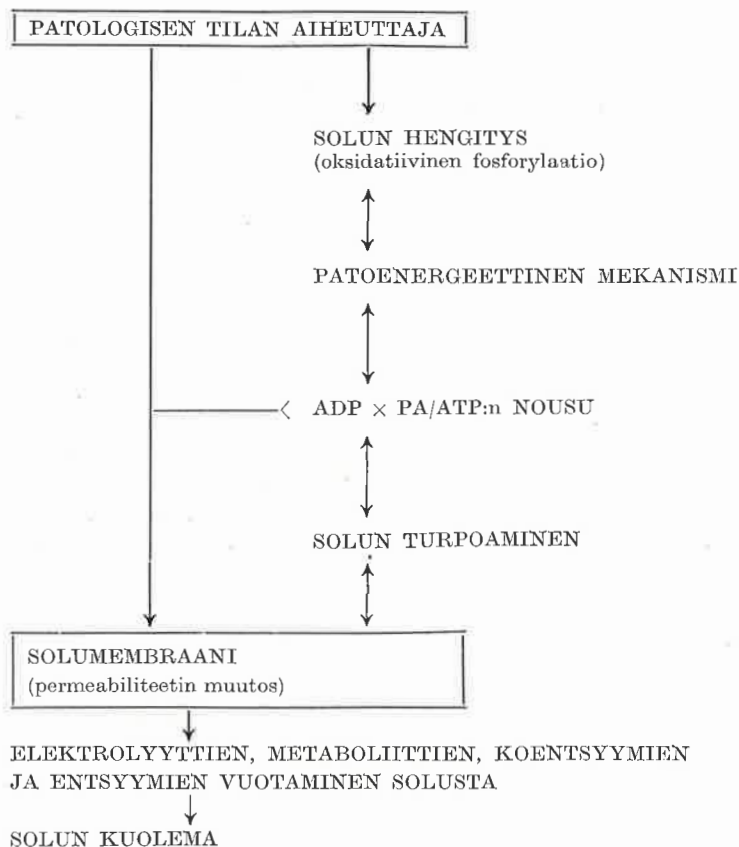
Kuvassa 1 on kaavamaisesti esitetty ne vaiheet, jotka johtavat solumembraanin huokosten avautumiseen ja solun hajoamiseen. Kun permeabiliteetin muutos on tapahtunut, seuraavat seikat vaikuttavat entsyymien vuotonopeuteen ja aktiviteettien nousuun plasmassa:

1. Entsyymien konsentraatio solussa (Kuva 2.)
2. Vaurioituneiden solujen määrä
3. Verenkierron vilkkaus vaurioituneen alueen ympärillä
4. Entsyymien lokalisaatio solussa (2)
5. Onko entsyymi liukoinen tai liukenematon (esim. partikkeleihin tai membraaniin sitoutuneena)

Membraanin hajoamistapahtumaa voidaan tutkia myös kokeellisesti. Warburg ja Hiepler (v. 1952) totesivat aldolaasin vuotavan ascites-soluista ympäröivään ascites-seerumiin, jos soluja inkuboitiin  $38^\circ\text{C}$ :ssa ilman glukosilisäystä. Toinen havainto oli aldolaasin vuotaminen enemmän anaerobisissa kuin aerobisissa olosuhteissa.

Bruns et al. tarkastelivat mm. LDH:n (laktaattidehydrogenaasi), ALD:n (aldolaasi) ja GOT:n (aspartaattiaminotransferaasi) aktiviteetin nousua injisoimalla koe-eläimen vatsaonteloon monojodasettaattia, salyrgaania, fluoretikkahappoa tai 2,4-dinitrofenolia.

Poikkeuksena patologisten tilojen entsyymiaktiivisuuksien nousuille on mainittava veren hyytymistapahtumaan osallistuvat entsyymit ja tekijät. Maksasairauksissa niiden synteesi hidastuu ja plasman entsyymitaso laskee. Kokeellisesti tämä voidaan osoittaa plasman hyytymisajan pitenemisenä.



Kuva 1. Kaavakuva patologisen entsyymivuodon mekanismista.

Entsyymi	Konsentraatiogradientti maksa/seerumi
Heksokinaasi	14 000
Glutamaattidehydrogenaasi	7 500
Alkoholidehydrogenaasi	23 000
Pyruvaattikinaasi	700
Laktaattidehydrogenaasi	3 000
Malaattidehydrogenaasi	4 000
Aspartaattiaminotransferaasi	11 600
Alaniiniaminotransferaasi	10 000
	punasolu/seerumi
Laktaattidehydrogenaasi	214
Fruktoosidifosfaattialdolaasi	108

Kuva 2. Eri entsyymien konsentraatiogradientti (määritetty aktiivisuusyksikköinä) välillä maksa/seerumi ja punasolu/seerumi.

### Entsyymien häviäminen verenkierrosta

Tiedot entsyymien häviämisestä verenkierrosta ovat vähäiset. Kokeellisesti on helppo todeta entsyymien eliminoituvan proteiinien tavoin plasmasta. Mutta se mekanismi, joka panee koko prosessin liikkeelle, kaippaa vielä paljon lisää selvitystä. Nykyisten tietojen mukaan häviäminen voi tapahtua seuraavia mekanismeja käyttäen:

1. entsyymien aktiivinen siirtyminen soluihin,
2. ” inaktivoituminen ja hajoaminen,
3. ” erityis.

1. Aiheesta on kirjoitettu ja keskusteltu. Konkreettiset tulokset puuttuvat kuitenkin täysin.

2. Luonnollisin tie proteiinien ja entsyymien häviämiselle on inaktivoituminen ja hajoaminen. Missä tämä tapahtuu, on vielä selvittämättä. Tutkimusten mukaan RES-systeemi (reticulo-endoteliaali-) ei osallistu tähän tapahtumaan. Jo entsyymi-proteiinin tertiäärirakenteessa tapahtuva muutos aikaansaa aktiivisten keskusten inaktivaation ja irreversiibelin denaturaation. Proteaasien hydrolysoiva vaikutus on huomioitava tekijä entsyymien inaktivaatiossa. Haimatulehduksissa rauhasen normaali erityis ruuansulatuskanavaan saattaa estyä, jolloin haiman sisäisen paineen noustessa erite (sisältää mm. trypsiiniä ja peptidaaseja) pyrkii purkautumaan helpointa mahdollista tietä, tässä tapauksessa verenkiertoon. Toisaalta plasmassa esiintyy myös proteaaseja inhiboivia antientsyymejä. Esim. lisättäessä trypsiiniä verenkiertoon sen aktiviteetti häviää nopeasti antitrypsiinin reagoitessa trypsiinin kanssa.

Denaturaatiota edistäviä tekijöitä ovat substraattien ja kofaktorien puuttuminen plasmasta. Substraatti ja kofaktori muodostavat entsyymin kanssa komplekseja, jolloin entsyymin aktiiviset keskukset säilyvät stabiilimpina. Lämpötilan alenemisella on tunnetusti entsyymejä stabiloiva vaikutus. Tähän perustuu ilmeisesti seuraavan tutkimuksen tulos: prostata carcinoma potilaan plasman hapnan fosfataasi nousi, alennettaessa kehon lämpötilaa alle 36 °C. Lämpötilan kohotessa normaalitasolle entsyymin aktiviteetti palautui ennalleen.

Eliminaationopeutta ei voida paljon säädellä, ja se tapahtuu lähes maksimikapasiteetilla. Jo yksi gramma sydänekudosta aiheuttaa vaurioituessaan havaittavan nousun plasman entsyymitasossa.

3. Entsyymejä erittyy sekä sapen että munuaisten kautta. Sappirakko konsentroi entsyymejä kuten sapen muitakin aineosia. LDH:n, MDH:n (malaattidehydrogenaasi), GPT:n (alaniiniaminotransferaasi) ja AP:n (aminopeptidaasi) aktiivisuudet ovat 10-kertaiset plasman vastaaviin arvoihin verrattuna. GOT:n

aktiivisuus sapessa on jopa 50-kertainen. Pitkäaikaiset sapon erityshäiriöt (esim. sappikivi) johtavat sapon entsyymitason laskuun (3.).

Entsyymien eritystoiminta munuaisten kautta jää vähäiseksi. Niiden suuri molekyylikoko (usein yli 100 000) on esteenä filtraatiolle glomeruluksissa (munuaiskeräset). Poikkeuksen muodostaa eritysentyyymi amylaasi (mp. 45 000), joka läpäisee glomerulukset. Sillä on kliinistä merkitystä haimatulehduksissa. Plasman amylaasi voi olla jo palautunut normaalitasolle, kun virtsasta vielä amylaasin aktiviteetti havaitaan kohonneeksi. Munuaissairauksille on luonteenomaista proteiinien (samalla myös entsyymien) esiintyminen virtsassa (proteinuria). Virtsasta tavattavat entsyymit voivat olla peräisin myös vaurioituneesta munuaiskudoksesta, kuten Rosalki et al. ovat todenneet (4.). He määrittivät eri munuaissairauksissa huomattavia LDH- ja GOT-aktiivisuuksia virtsasta, kun samalla plasman vastaavien entsyymien aktiivisuudet olivat normaalitasolla.

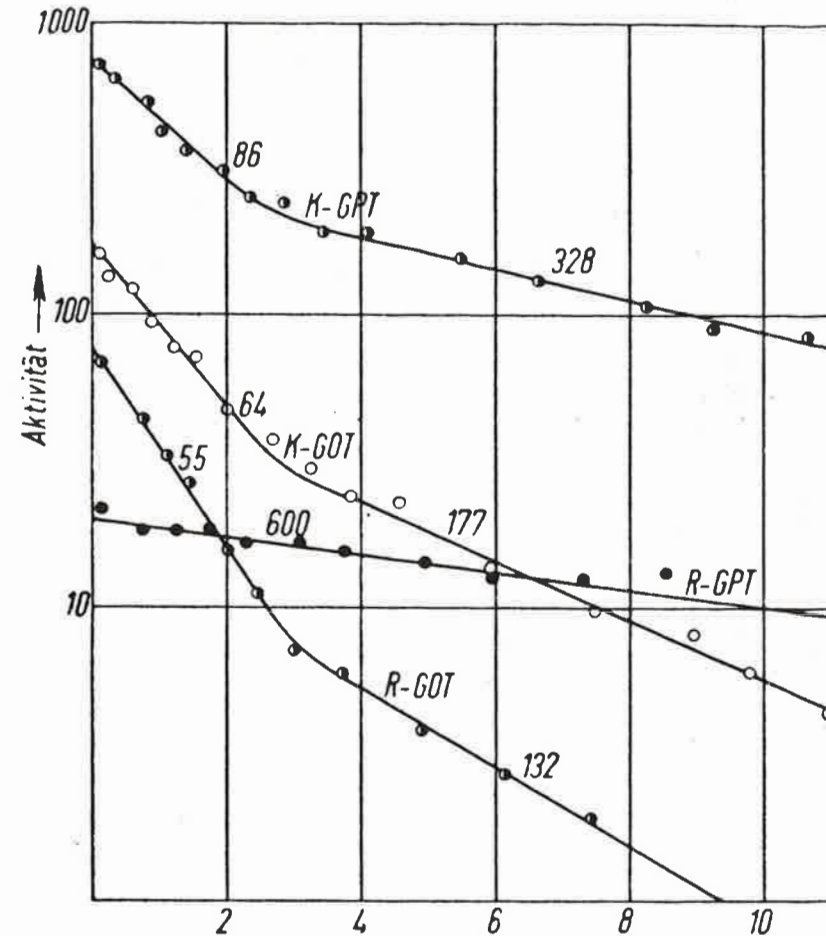
Entsyymejä erittyy myös suolistossa. Normaali oloissa plasmaa erittyy 13–25 ml/vrk. Patologisissa tiloissa vuoto voi nousta jopa 600 ml/vrk (5.).

Entsyymien häviämistä voidaan tutkia injisoimalla verenkiertoon entsyymejä ja seuraamalla aktiivisuuksien laskua ajan funktiona (6.). Muodostuva häviämiskäyrä on kaksivaiheinen (Kuva 3.). Ensimmäinen vaihe on nopea ja se kuvaa entsyymin leviämistä plasmaan ja ekstraselulääritilan. Toinen vaihe esittää varsinaista eliminaationopeutta. T  $\frac{1}{2}$ -ajat vaihtelevat eri entsyymeillä. Kuvassa 3 nähdään, miten saman substraattispesifisyyden omaavan, mutta eri syntyperää olevan entsyymin häviämisenopeudessa on eroa. Verrattaessa saman koe-eläimen (kanin) seerumin albumiinin T  $\frac{1}{2}$ -aikoja entsyymien puoliintumisaikoihin (1.-vaihe 3,6 t ja 2.-vaihe 4,8 vrk), entsyymien vastaavat ajat ovat paljon lyhempiä (1.-vaihe n. 1 t ja 2.-vaihe 2–10 t). Patologisissa aktiviteettimuutoksissa häviämiskäyrän kaksifaasisuutta ei saada esille. Vuoto ei tapahdu momentaarisesti, vaan se voi jatkua useiden päivien ajan. Tällöin vaiheet sekoittuvat toisiinsa, ja T  $\frac{1}{2}$ -ajaksi saadaan luku kaksifaasisen käyrän T  $\frac{1}{2}$ -aikojen väliltä.

#### Entsyymiaktiivisuus fysiologisissa olosuhteissa

Saman entsyymin normaalitaso eroaa eri lajeilla. Esim. aldolaasi

ihmisellä	n.	4,5 yks/ml
koiralla	”	15 ”
rotalla	”	44 ”
hiirellä	”	100 ”



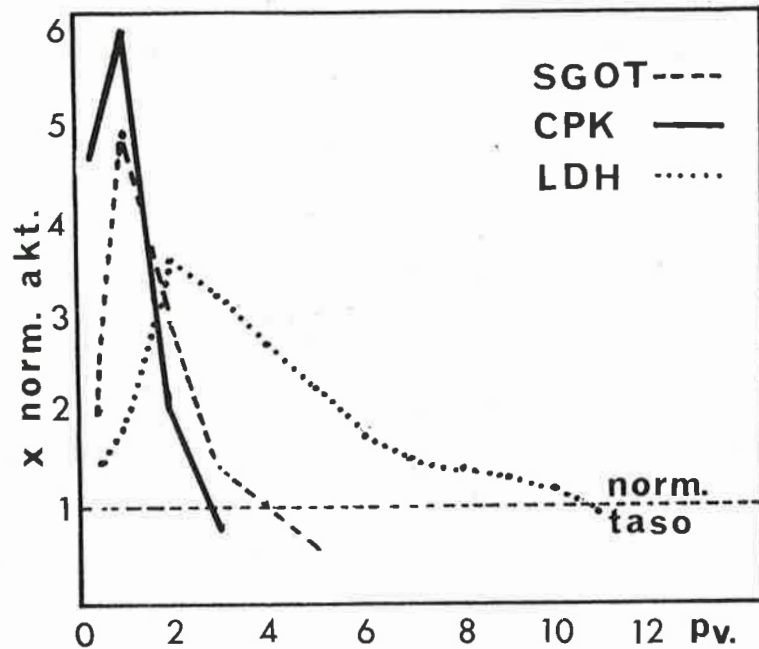
Kuva 3. GOT- ja GPT-aktiivisuuksien häviämiskäyrät kanilla tutkittuna K-GOT ja K-GPT = kanin maksasta eristettyjä. R-GOT ja R-GPT = sian sydäimestä eristettyjä. Ordinaatta: akt.yks. = uMol/mlseerumi/tunti. Abskissa: injektioista kulunut aikaa tunteina. Käyrien päällä olevat luvut ovat T  $\frac{1}{2}$ -aikoja = min (6.).

Luettelo osoittaa aldolaasiaktiviteetin olevan kääntäen verrannollinen eläimen kokoon. Sikiökaudella entsyymitaso on vaihteleva eri kehitysvaiheissa. Iän mukana havaitaan lievää entsyymitason nousua (7.). Myös raskas lihastyö saattaa nostaa entsyymitasoa (8.). Näitä kokeita on tehty sekä ihmisellä että eläimillä. Ihmisillä havaittiin eroa huonokuntoisten ja fyysisesti voimakkaiden henkilöiden välillä. Harjoittelemattomilla ja huonokuntoisilla koehenkilöillä entsyymitaso nousi herkemmin ja enemmän rasituksen aikana. Tämä johtuu lähinnä aerobisen energiatuoton vähenemisestä (kts. Kuva 1.).

*Entsyymiaktiivisuus patologisissa olosuhteissa*

Patologisten tilojen entsyymiaktiivisuuksien muutokset muodostavat usein komplisoidun ja vaikeasti tulkittavan kokonaisuuden. Aiheen laajuuden vuoksi tässä tyydytään vain kahteen yksinkertaiseen esimerkkiin.

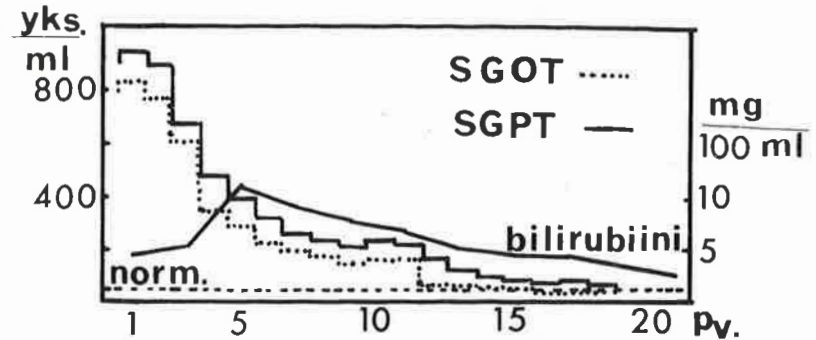
Sydänveritulppa (Kuva 4.).



Kuva 4. GOT-, CPK- ja LDH-aktiivisuuksien muutokset sydäninfarktin jälkeen.

Sydäninfarktille on tyypillistä nopeat entsyymiaktiivisuuksien nousut. Tällaisissa äkillisissä entsyymivuodoissa plasman entsyymiaktiivisuudet noudattavat vaurioituneen kudoksen entsyymimallistoa, ts. mitä suurempi konsentraatio solussa sitä enemmän entsyymiä esiintyy plasmassa (8.). CPK (kreatiini-fosfokinaasi), joka on spesifisesti lihasperäinen, nousee herkimmin, mutta sen  $T_{1/2}$ -aika on lyhyt. GOT ei ole spesifinen sydänlihakselle, mutta sitä käytetään kuitenkin LDH:n (iso-entsyymit) (9.) ohella infarktitaapausten diagnostiikassa. LDH saavuttaa maksiminsa vähän myöhemmin (2–3 vrk infarktista) kuin CPK ja GOT.

Virus hepatiitti (Kuva 5.).



Kuva 5. GOT- ja GPT-aktiivisuuksien muutokset virus hepatiitin aikana.

Maksasairauksissa tilanne on komplisoidumpi. Plasman entsyyminousut eivät vastaa enää vaurioituneen kudoksen entsyymimallistoa samassa suhteessa (8.). GOT on herkin hepatiitin osoittaja. Sen rinnalla usein määritettävä GPT on melkein yhtä herkkä ja käyttäytyy muutenkin GOT:n tavoin. Maksan spesifiset entsyymit (esim. OCT = ornitiinikarbamyl-transferaasi ja SDH = sorbiittidehydrogenaasi) nousevat vain maksasairauksissa. Niiden heikkoutena on määritysmenetelmän epäherkkyys, ja ne häviävät plasmasta nopeasti. Maksasairauksien kliinisiä oireita (keltaisuus) aiheuttava bilirubiini nousee plasmassa entsyymejä myöhemmin.

Entsyymitason muutokset eri tautitiloissa ovat tarkoin tutkitut. Lääketiede ei kuitenkaan tyydy tähän, vaan yhä edelleen plasmasta löytyy entsyymejä, joilla mahdollisesti on kliinistä merkitystä. Tällaisia ns. läpilyöntiasemassa olevia entsyymejä ovat mm.  $\gamma$ -glutamyltranspeptidaasi (nousee herkästi infektiosairauksissa) ja mukopeptidiglukohydrolaasi (vapautuu plasmasta granulosyyttien hajotessa).

## Kirjallisuusluettelo:

- Henley, K. S., Schmidt, E., Schmidt, F. W.*, Enzymes in Serum, 1966, Charles C. Thomas, Illinois, USA.
- Greenberg, D. M., Harper, H. A.*, Enzymes in Health and Disease, 1960, Charles C. Thomas, Illinois, USA.
- Hess, B.*, Enzyme in Blutplasma, 1966, Georg Thiem Verlag, Stuttgart
- Advances in Immunology, I (1961), V (1966), VI (1967).
1. *Saukkonen, H.*, Suomen Kemistiseuran Tiedonant. 77 (1968).
  2. *Saris, N.-E.*, Suomen Kemistiseuran Tiedonant. 77 (1968).
  3. *Lorentz, K.*, Klinische Wochenschrift, 41: 1, (1963), 18—21.
  4. *Rosalki, S. B., Wilkinson, J. H.*, Lancet, 2, (1959), 327—328.
  5. *van Tongeren, J. H. M., Reichert, W. J.*, Clinica Chimica Acta, 14, (1966), 42—48.
  6. *Amelung, D.* Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem., 318, (1960), 219.
  7. *von Dubach, U. C.*, Helvetica Medica Acta, 28, (1961), 469—475.
  8. *Henley, K. S., Arbor, A., Schmidt, E., Schmidt, F. W.*, J. Amer. med. Ass., (1960), 977—981.
  9. *Levonen, E.*, Suomen Kemistiseuran Tiedonant. 77 (1968).

## Isoentsyymeistä\*

Eeva Levonen

Helsingin yliopistollinen keskussairaala, Helsinki

Isoentsyymien historia on verraten nuori, sillä sen voidaan katsoa alkavan varsinaisesti vasta vuonna 1957, jolloin Wieland ja Pfeleiderer osoittivat, että samassa kudoksessa voi esiintyä laktaattidehydrogenaasia useammassa, toisistaan fysikaalisin keinoin erotettavassa muodossa ja jolloin Vessel ja Bearn saivat saman entsyymin jakautumaan seerumin tarkkelysgeeli-elektroforeesissa kolmeen osaan. Vielä Sayre ja Hill, hekin samana vuonna, jakoivat seerumin laktaattidehydrogenaasin useaan fraktioon virtauselektroforeesia sekä kromatografiaa ja gradienttieuutiota käyttäen. Aikaisemminkin oli tunnettu tosiasia, että eri eliöistä peräisin olevat entsyymit — vaikka olivatkin substraattispesifisyydeltään yhtäläiset — saattoivat poiketa toisistaan monien kemiallisten ja fysikaalisten ominaisuuksien suhteen.

Ensimmäinen selvästi isoentsyymejä koskeva työ on kuitenkin peräisin jo vuodelta 1950, jolloin Meister oli jakanut kiteisen laktaattidehydrogenaasin elektroforeettisesti kahteen fraktioon. Kaksi vuotta myöhemmin osoitettiin kummankin näistä olevan aktiivisen entsyymin. Kromatografisten ja elektroforeettisten menetelmien kehittyminen ja monipuolistuminen ja erityisesti Smithieksen v. 1955 julkaisema tarkkelysgeeli-elektroforeesitekniikka, jolla seerumistakin saatiin useita uusia fraktioita erilleen, antoivat vauhtia isoentsyymitutkimukselle viisikymmenluvun loppupuoliskolla.

Isoentsyymikäsitteen täsmällinen rajaaminen on vaikeaa, sillä toisena äärimmäisyytenä on esitetty, että kaikista saman entsyymaattisen spesifisyyden omaavista proteiineista käytettäisiin tätä nimitystä ja toisena, että vain sellaiset entsyymi-proteiinit, joiden synteesiä säätelee sama perintötekijä, olisivat isoentsyymejä ja saman entsyymiaktiivisuuden omaavat proteiinit, joiden synteesiä säätelevät eri perintötekijät, olisivat heteroentsyymejä. Käytännössä lienee parasta pitäytyä IUB:n

\* Esitelmä Kemian Päivien klinisen biokemian symposiumissa Helsingissä 26. 10. 67.

entsyymikomitean suositukseen, jonka mukaan isoentsyymillä tarkoitetaan yhdessä eliölajissa esiintyvän tietyn entsyymien eri muotoja.

On vain osittain selvitetty, mistä entsyymien monimuotoisuus johtuu, mutta ainakin seuraavat tekijät aiheuttavat sitä:

Perintötekijäin vaikutus joko suoraan entsyymiproteiinin primääriosan synteisiin tai solun säätelymekanismien välityksellä molekyylin perusosien yhteenliittymiseen.

Solun eri rakennesosissa entsyymiproteiinin rakenne on usein erilainen. Niinpä hajoavista soluista seerumiin joutunut aspartaattiaminotransferaasi hajoo elektroforeesissa kahteen fraktioon, joista toinen on peräisin soluplastimasta ja toinen mitokondrioista, eikä jakautumismalliin vaikuta lainkaan se mistä kudoksesta entsyymi on lähtöisin.

Seerumissa voivat entsyymimolekyylit sitoutua eri proteiini-fraktioihin ja esimerkiksi elektroforeesissa liikkua näiden mukana. Kudoksista irronneet entsyymiproteiinit voivat vielä osittain hajota ja siten muuttua fysikaalisilta ominaisuuksiltaan menettämättä silti aktiivisuuttaan.

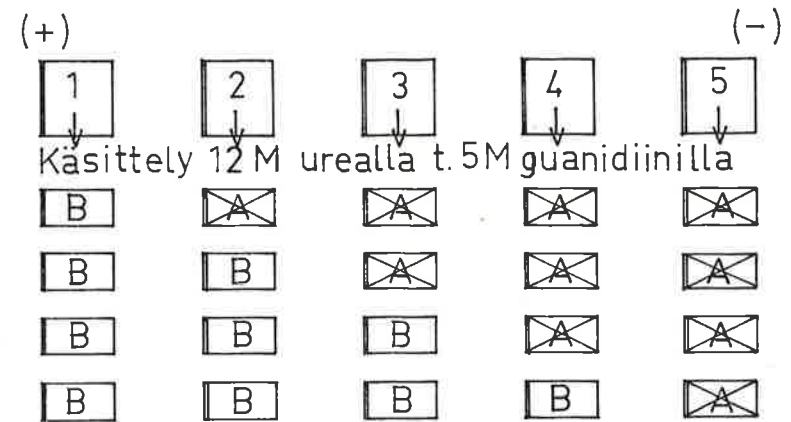
Laktaattidehydrogenaasin isoentsyymien rakenne on tois-taiseksi parhaiten selvitetty ja koska niitä koskeva tutkimus on perustavaa alallaan valottaen lisäksi tutkimuksen yleisiä suunta-viivoja, lienee aiheellista selostaa sitä yksityiskohtaisemmin.

Kun Wieland ja Pfliegerer v. 1957 olivat löytäneet lähes kai-kissa tutkimissaan kudoksissa laktaattidehydrogenaasia useana, joskus jopa viitenä fraktion, havaitsivat seuraavan vuoden aikana useat tutkijat sen diagnostisen merkityksen, mikä näi-den fraktioiden seerumissa esiintymisellä oli. Yleinen mielen-kiinto asiaan heräsi ja monella taholla tutkittiin entsyymiä soveltaen nykyisinkin käytännössä olevia menetelmiä: elektroforeesia erilaisissa kantaja-aineissa, ioninvaihtaja- ja geeli-filtraatiokromatografiaa. Pylväselektroforeesilla ja -kromato-grafialla voitiin jakeita saada niin suuria määriä, että niiden lähempi tutkiminen oli mahdollista.

Laktaattidehydrogenaasista saatujen viiden jakeen (LD<sub>1</sub>—LD<sub>5</sub>) molekyylipaino oli jokseenkin sama n. 135 000 ja elektroforeesissa kiintyi huomio jakeiden välimatkojen yhtäläisyyteen, mikä selittyi Wachsmutin työtovereineen todettua, että 6 N suolahapolla aminohaposteelle hydrolysoituissa jakeissa emäk-sisten aminohapojen osuus aleni ja happamien nousi tasaisesti siirryttäessä anodisimmasta LD<sub>1</sub>:stä katodisempiin jakeihin aina LD<sub>5</sub>:een asti.

Kaikki viisi jaetta osoittautuivat 12 M urea- tai 5 M guani-diiniliuoksessa dissosioituvan neljäksi yhtäsuureksi monomee-riksi. Appella ja Markert osoittivat LD<sub>1</sub>:n monomeerien olevan keskenään yhtäläiset, mutta poikkeavan LD<sub>5</sub>:n monomeereistä,

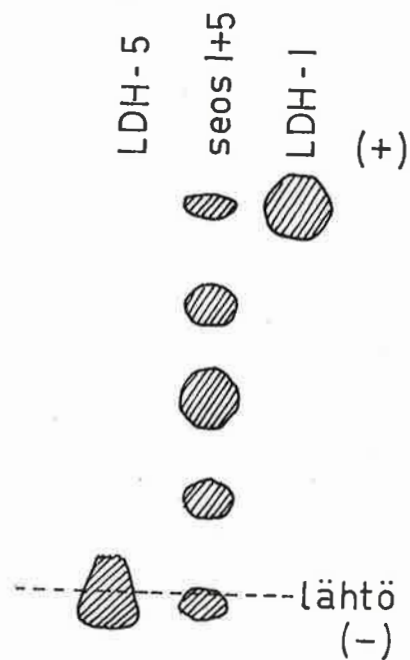
jotka ne taas olivat keskenään samanlaiset. Edelliset he nimit-tivät alayksikkö B:ksi ja jälkimmäiset alayksikkö A:ksi aikai-semmin Yhdysvalloissa käytetyn numeroinnin perusteella, jonka mukaan pisimmälle anodiin päin kulkeva fraktio olisi LD<sub>5</sub> ja lähimpänä katodia oleva LD<sub>1</sub>. Näytti siltä, että LD<sub>2</sub>, LD<sub>3</sub> ja LD<sub>4</sub> olisivat LD<sub>1</sub> ja LD<sub>5</sub> välimuotoja ja koostuneet sekä A:sta että B:stä. (Kuva 1.)



Kuva 1. Laktaattidehydrogenaasin jakeiden dissosioituminen monomeereiksi ja niiden koostuminen A ja B monomeereistä.

Näin onkin osoitettu olevan. Markertin onnistui v. 1963 dis-sosioida LD-fraktiot monomeereiksi ilman, että entsyymiaktii-visuus palautumattomasti hävisi. Jäädettämällä fraktiot 1 M NaCl liuoksessa ja sulattamalla usean tunnin kuluttua voitiin tetrameerit hajoittaa monomeereiksi, jotka sitten liittyivät uudelleen aktiivisiksi tetrameereiksi. Markert sekoitti yhtä suuret määrät puhdasta LD<sub>1</sub> ja LD<sub>5</sub> 1 M NaCl-liuokseen, jää-dytti ja sulatti seoksen ja tutki tätä elektroforeettisesti. Puhtaat lähtöfraktiot pysyivät elektroforeesissa yhtenäisenä, selvä-rajaisena täplänä, mutta jäädytetty seos hajosi viideksi frak-tioksi (Kuva 2.) LD<sub>1</sub>—LD<sub>5</sub> sarjan fraktioiden määrien suhde oli 1 : 4 : 6 : 4 : 1, mikä vastaa kahden monomeerin sattuman-varaista tetrameereiksi ryhmittymistä.

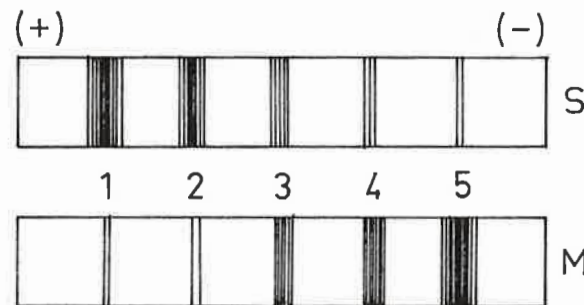
LD isoentsyymit poikkeavat toisistaan myös biokemiallisten ominaisuuksiensa puolesta. Ero on suurin LD<sub>1</sub>:n ja LD<sub>5</sub>:n välillä, LD<sub>2</sub> muistuttaa LD<sub>1</sub>:tä ja LD<sub>4</sub> muistuttaa LD<sub>5</sub>:tä. LD<sub>1</sub> esiintyy sellaisissa soluissa, joiden hapensaanti on turvattu ja joissa glukoosi hapettuu täydellisesti sitruunahappokierrossa.



Kuva 2. Markertin elektroforeettinen analyysi puhdistetuista LD<sub>1</sub> ja LD<sub>5</sub> fraktioista sekä (keskellä) 1 M NaCl:ssä jäädytetystä ja senjälkeen sulatetusta seoksesta, jossa alunperin oli kumpaakin fraktiota yhtä paljon.

Eniten sitä on sydänlihaksen soluissa ja punasoluissa. LD<sub>5</sub> kykenee pelkistämään suuria määriä pyruvaattia maitohapoksi ja sitä taas on eniten maksassa ja liikuntalihaksissa. LD<sub>5</sub>:n optimaalinen pyruvaattikonsentraatio on n. kymmenen kertaa suurempi kuin LD<sub>1</sub>:n. LD<sub>1</sub> pelkistää yhtä hyvin  $\alpha$ -ketobutyraattia kuin pyruvaattia kun taas LD<sub>5</sub> aktiivisuus  $\alpha$ -ketobutyraattia substraattina käytettäessä on vain 20–30 % siitä, mitä se on pyruvaattia käytettäessä. Kumpaakin toisistaan poikkeavuutta substraattien suhteen on käytetty sydän- ja maksaperäisen LD:n osuuden määrittämiseen kokonaisaktiivisuudesta, mutta on vielä muitakin merkittäviä eroja LD<sub>1</sub>:n ja LD<sub>5</sub>:n välillä. LD<sub>1</sub> on monessa suhteessa pysyvämpi kuin LD<sub>5</sub>: 2 M urea ja kuumentaminen aina 60 °:een eivät vaikuta sanottavasti LD<sub>1</sub>:n aktiivisuuteen kun taas LD<sub>5</sub> inaktivoituu täysin kummallakin käsittelyllä. Jo jääkaapissa säilyttäminen mutta ennenkaikkea jäädyttäminen alentavat myös LD<sub>5</sub>:n aktiivisuutta, mutta eivät vaikuta LD<sub>1</sub>:n aktiivisuuteen. Vielä voidaan nämä fraktiot erottaa toisistaan DEAE ioninvaihtoselluloosan avulla.

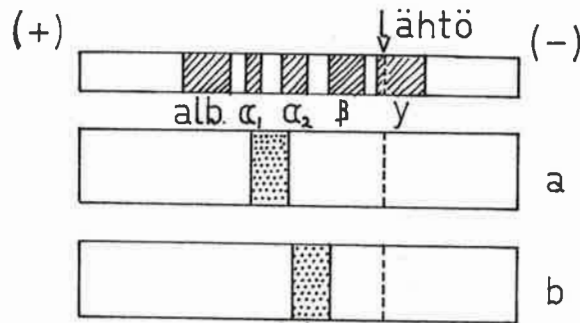
Käytännön työskentelyssä useinkin käytetään elektroforeesia eri elimistä peräisin olevien isoentsyymien erottamiseen toisistaan. Elektroforeesin jälkeen jakeet osoitetaan käyttäen alunperin kudosleikkeiden tutkimiseen kehitettyjä menetelmiä, LD:n laktaattista irrottama vety siirretään tetratsoliumsuolalle, josta muodostuu liukenematonta värillistä formatsaania. Agargeeli-elektroforeesissa käytetään niin paljon näytettä, että syntynyt väri on kvantitoitavissa, mutta eri jakeiden silmämääräinen arviointi on mahdollista myös käyttäen nopeaa ja vaivatonta mikroelektroforeesia selluloosa-asetaatissa. Elektroforeesilla saadaan näkyviin myös sellaisten jakeiden osuuden kasvu, jotka eivät vaikuta kemiallisesti määritettävissä olevaan isoentsyymisuhteeseen. Näin on laita esimerkiksi pahanlaatuisissa prosesseissa, joissa seerumin kohonnut LD on jakautunut kuten normaaliseerumissa fraktioiden 2,1 ja 3 ollessa vallitsevina. Maksa- ja sydänperäiset LD-isoentsyymit esiintyvät elektroforeesissa tyypillisenä jakautumamallina (Kuva 3.), joka käytännössä useimmiten antaa saman informaation kuin kemiallisesti määritettyjen isoentsyymisuhteiden monesti tulkinvaraiset laskeut arvot.



Kuva 3. Kaavamainen esitys LD isoentsyymien osuuksista seerumissa sydäninfarkti- (S) ja hepatitis- (M) potilaalla.

Tällä hetkellä lienee tiedossa lähes kolmenkymmenen entsyymin jakautuminen isoentsyymeiksi, mutta sairaalan rutiinilaboratoriossa tutkittaneet laktaattidehydrogenaasin lisäksi yleisemmin vain alkaalisen fosfataasin isoentsyymejä. Elektroforeesi tapahtuu yleensä agar- tai tärkkelysgeelissä ja fraktiot tehdään näkyviksi histokemiallisia värjäysmenetelmiä käyttäen. Helpointa lienee käyttää substraattina  $\alpha$ -naftylfosfaattia, josta entsyymien lohkaistua fosfaatin jäljelle jäävä  $\alpha$ -naftoli reagoi muodostaen liuoksessa mukana olevan diatsoniumsuolan kanssa liukenemattoman värin. Glyserofosfaatti-kalsium-raskasmetalli-värjäyksiä on vaikeampaa saada onnistumaan ainoaan agarissa, jonka happamet ryhmät sitovat metalli-ioneja.

Seerumissa lisääntyneen alkaalisen fosfataasin alkuperä, luusto vai maksa, on mahdollista selvittää isoentsyymien kulkemasta matkasta. Maksaperäinen kulkee  $\alpha_1$  ja  $\alpha_2$  fraktioiden, ja luustoperäinen  $\alpha_2$  ja  $\beta$  fraktioiden välillä (Kuva 4.). Normaalisissa seerumissa esiintyvä hyvin heikko alkaalisen fosfataasin fraktio on näiden kahden välillä.



Kuva 4. Alkaalisen fosfataasin isoentsyymit agarosigeelielektroforeesissa: a) maksaperäinen b) luustoperäinen.

Leusylaminopeptidaasin isoentsyymien kliinisestä merkityksestä esiintyy melko ristiriitaisia tietoja. Niiden, samoin kuin esteraasin monilukuisten isoentsyymien tutkimista on harrastettu paljon tieteellisessä mielessä eri yhteyksissä. Kolinesteraasin isoentsyymeillä on merkitystä perinnöllisyystutkimuksen kannalta, mutta myös alkaalisella fosfataasilla ja eräillä dehydrogenaaseilla, myös laktaattidehydrogenaasilla, esiintyy periytyviä poikkeuksellisia isoentsyymijakautumia.

Entsyymiproteiinien heterogeenisyyden syyt, mahdollinen biologinen tarkoituksenmukaisuus, sen ilmeneminen yksilökehityksen eri vaiheissa ja monet muut tähän liittyvät kysymykset tarjoavat vielä laajan työkentän. Isoentsyymitutkimuksen suuntaviivat on kuluneiden kymmenen vuoden aikana hahmoteltu ja perusta luotu, mutta tuskin aavistamme kaikkia sen tarjoamia mahdollisuuksia. Käytännön työssäkin voimme kuitenkin jo nyt käyttää hyväksi tähän mennessä tehdyn tutkimustyön tuloksia.

#### Aiheeseen liittyvää kirjallisuutta:

1. J. King: Practical Clinical Enzymology, D. Van Nostrand, London 1965.
2. J. Henry Wilkinson: Isoenzymes, E. & F.N. Spon, London 1965.
3. R. Ruyssen and L. Vandenriessche: Enzymes in Clinical Chemistry, Elsevier, Amsterdam 1965.

## Entsyymien määrittämisessä huomioon otettavat tekijät

H. Saukkonen

Helsingin yliopistollinen keskussairaala

Entsyymimääritykset ovat viime vuosina vallanneet kliinikemiallisen laboratorion työstä melkoisen osuuden. Tämä johtuu suuresta määrin yksinkertaisten, rutiinityöhön sopivien tutkimusmenetelmien kehittymisestä. Entsyymiproteiinin määrää sinänsä ei yleensä pystytä mittaamaan. Sen vuoksi määritykset perustuvat miltei poikkeuksetta entsyymien katalysoiman reaktion nopeuteen. Tämä on luonteeltaan herkästi muuttuva ja vain tietyissä oloissa suoraan verrannollinen entsyymien konsentraatioon, joten entsyymimäärityksissä on huomioitava useampia tekijöitä kuin kvantitoitaessa tavallisia orgaanisia ja epäorgaanisia aineita.

#### Aktiivisuusyksiköistä

Entsyymien katalyyttiset aktiivisuudet on aikaisemmin ilmoitettu yksinomaan mielivaltaisina, menetelmien keksijän määrittelemänä yksikköinä. Tästä johtuen on eri laboratoriorien tulosten vertailu ollut erittäin vaikeaa.

Asian korjaamiseksi suositteli International Union of Biochemistry'n entsyymikomissio v. 1961 kansainvälisen yksikön (IU) käyttöön ottoa. IU tarkoittaa entsyymimäärää, joka aikaansaa substraatin yhden  $\mu$ moolin muuttumisen minuutissa, optimiolloissa. Lämpötilaksi suositeltiin 25°C:ä, mutta se muutettiin v. 1964 30°C:ksi (Enzyme Nomenclature, 1964). Näytteen tilavuusyksiköksi suositellaan kliinisessä kemiassa litraa (Dybkaer & Jörgensen, 1967), joten entsyymiaktiivisuudet tulisi ilmoittaa yksikössä IU/l eikä mIU/ml.

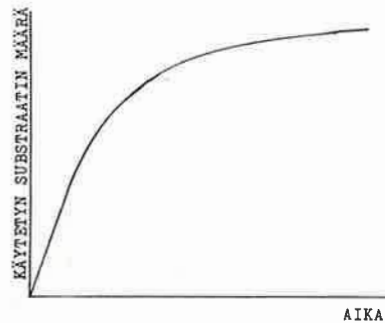
Yhtenäisen yksikön käyttö ei kuitenkaan tee tuloksia vertailukelpoisiksi eikä lievitä sekaannustilaa. Päinvastoin se saattaa aiheuttaa lisää hämminkiä, ellei pidetä huolta siitä, että mittauksia suoritettaessa reaktio-olosuhteet ovat optimaaliset ja että entsyymikinetiikan perusasiat on huomioitu. Kaikki käytössä olevat menetelmät eivät täytä em. ehtoja, ja sen vuoksi tulisi vastauksista IU:n ohella käydä ilmi myös tutkimusmenetelmä.

Entsyymikonsentraatioiden ilmoittamisessa on ehdotettu käytettäväksi myös "aktiivisuusindeksiä" tai "aktiivisuus-suhdetta" (King, 1965). Tällöin normaalin ylärajaa pidettäisiin 1:nä ja tulokset ilmoitettaisiin sen funktiona. Vastaukset olisivat suuressa määrin menetelmästä riippumattomat, eikä tarvitsisi muistaa normaaliarvoja. Normaaliarvojen rajat olisi kuitenkin määrättävä kussakin laboratoriossa hyvin huolellisesti. Ehkä tästä johtuen systeemiä ei ole toistaiseksi käytetty ainakaan Suomessa.

### Entsyymireaktion kinetiikkaa

Entsyymireaktion nopeutta määrättäessä mitataan joko tietynä aikana käytetyn substraatin tai syntyneen tuotteen määrä tai katsotaan aika, joka kuluu tietyn kemiallisen tai fysikaalisen muutoksen tapahtumiseen.

Kuviossa 1 on esitetty tyypillinen entsyymireaktion kulku. Siitä nähdään, että reaktion nopeus on suurin alussa ja pysyy jonkin aikaa vakiona, mutta hidastuu vähitellen ajan mukana.



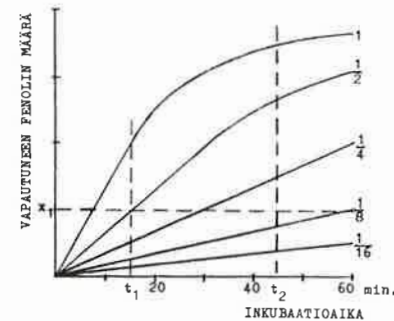
Kuva 1. Entsyymireaktion tyypillinen kulku.

Mediumin kokoonpano tunnetaan vain 0-hetkellä. Olosuhteet pysyvät muuttumattomina tietyn ajan reaktion alussa, jolloin reaktio noudattaa 0-kertaluvun kinetiikkaa, ja sen nopeus on riippuvainen ainoastaan entsyymin konsentraatiosta, mikäli koelosuhteet ovat optimit.

Nopeuden väheneminen voi johtua monista tekijöistä, esim. reaktiotuotteiden inhiboivasta vaikutuksesta, substraatin tai koentsyymin määrän liiallisesta laskusta, vastareaktion nopeuden lisääntymisestä tai entsyymiproteiinin osittaisesta denaturoitumisesta inkubaation aikana.

0-kertaluvun jälkeen entsyymireaktion kineettinen kertaluku saattaa pysyä 1:nä, jolloin aktiivisuus voidaan joskus määrätä tiettyyn muutokseen kuluneen ajan avulla. Tällaiset menetelmät soveltuvat kuitenkin harvoin rutiinikäyttöön. Lineaarisen osan jälkeen reaktion kuvaaja ei yleensä seuraa mitään standardimuotoa, ja siihen sopivan yhtälön johto voi olla erittäin vaikeaa. Tämän vuoksi entsyymien aktiivisuuksia tutkittaessa tulee mittana pitää reaktion alkunopeutta, johon hidastavat tekijät eivät vielä ole vaikuttaneet.

Entsyymimäärityksissä käytettävän näytemäärän ja inkubaatioajan pituuden merkitys käy ilmi kuviosta 2. Siinä esitetyt tulokset on saatu seerumin alkalisen fosfataasin tutkimuksista, joissa on käytetty erilaisia seerumilaimennoksia (King, 1965). Kuvion mukaan reaktioiden alkunopeusalueella saadaan luotettavia tuloksia pidetäänpä vakiona  $x_1$ :ä eli havaittavaa muutosta tai reaktioaikaa,  $t_1$ . Molemmat ovat suhteessa entsyymin määrään, tiettyyn muutokseen tarvittava aika suhtautuu siihen kääntäen verrannollisesti ja tiettyssä ajassa tapahtunut muutos suoraan verrannollisesti. Sen sijaan jos inkubaatioaika on pitempi, esim.  $t_2$ , on muutos suoraan verrannollinen entsyymin määrään vain kolmessa laimeimmassa näytteessä. Ylemissä kuvaajissa reaktioiden kineettinen kertaluku ei ole enää 0, eivätkä muutokset ole suoraan verrannollisia entsyymin määrään.



Kuva 2. Entsyymikonsentraation vaikutus reaktion kulkuun. Kuviossa on esitetty reaktiotuotteen määrä inkubaatioajan funktiona. Kunkin reaktio-kuvaajan oikeassa reunassa oleva luku tarkoittaa kyseisessä inkubaatioseoksessa ollutta suhteellista entsyymin konsentraatiota.

Entsyymiaktiivisuuden mittana voidaan siis pitää vain reaktion alkunopeutta ja tämän säilyttämiseksi on määrityksissä käytettävä aina mahdollisimman pientä näytemäärää ja mahdollisimman lyhyttä reaktioaikaa.

Ns. yksittäisnäytemenetelmiä pystytettäessä tulisi ehdottomasti tarkistaa, minkä aktiivisuuden yläpuolella olevat näytteet on laimennettava tai tutkittava käyttäen lyhennettyä inkubaatioaikaa. Kineettisissä menetelmissä sen sijaan nähdään koko ajan, tapahtuuko reaktio lineaarisesti.

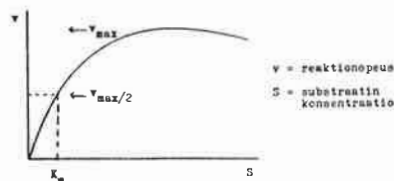
### Optimiolosuhteet

Entsyymireaktion nopeuteen vaikuttavat entsyymien määrän lisäksi monet muutkin tekijät. Tärkeimmät näistä ovat substraatin, koentsyymien sekä aktivaattorien laatu ja konsentraatio, käytetty puskuri ja lämpötila.

Määritykset tulisi suorittaa optimioloissa. Toisin sanoen inkubaatioseoksessa tulisi olla kaikkia tarvittavia aineita sellaisina konsentraatioina, ettei mikään aineiden muuttaminen aiheuta aktiivisuuden lisäystä. Käytännössä saattaa tällaisen tilan aikaansaaminen olla joskus vaikeaa, jopa mahdotonta. Määritykset on pyrittävä kuitenkin, mikäli mahdollista, suorittamaan optimioloissa, koska vain tällöin reaktion nopeutta voidaan pitää entsyymiaktiivisuuden todellisena mittana.

### Substraatin, koentsyymien ja aktivaattorien vaikutus reaktionopeuteen

Substraatin konsentraatio vaikuttaa ratkaisevasti reaktionopeuteen, kuten kuviosta 3 nähdään. Siinä on esitetty reaktion alkunopeus substraattikonsentraation funktiona entsyymien määrän pysyessä vakiona.



Kuva 3. Substraatin konsentraation vaikutus entsyymireaktion nopeuteen.

Substraatin konsentraation ollessa matala lisää sen vähäisenkin nousu huomattavasti entsyymien ja substraatin törmäysmahdollisuutta ja aiheuttaa siten mitatun aktiivisuuden vastaavan nousun. Vähitellen substraatin lisäämisen vaikutus pienenee ja lopuksi saavutetaan tila, jossa lisäys ei enää nosta reaktionopeutta. Substraatin konsentraation on siis oltava kyllin korkea, jotta alkunopeus olisi siitä riippumaton.

Jos substraattia lisätään huomattavasti vielä optimikonsentraation jälkeen, seuraa usein reaktionopeuden lasku todennäköisesti substraatin inhiboivasta vaikutuksesta johtuen (Mäkinen, 1967).

Optimaalinen substraattikonsentraatio, jolla saadaan reaktion suurin alkunopeus, lasketaan Michaelis'in vakion eli  $K_m$ :n avulla. ( $K_m$  tarkoittaa substraatin konsentraatiota, jonka välillä reaktion alkunopeus on puolet maksimaalisesta nopeudesta.)  $K_m$  kuvastaa entsyymien substraattiaffiniteettia, ja sen tuntemisella on käytännön merkitystä. Se on erilainen samalla entsyymillä eri substraattien suhteen ja on lisäksi olosuhteista riippuva, joten se tulisi tarkistaa aina menetelmää pystytettäessä.

Substraatin konsentraatio ei saisi olla reaktion nopeutta rajoittavana tekijänä. Sen kliniseen työhön sopivaksi konsentraatioksi on Richterich (1965) ehdottanut  $10 \times K_m$ , mutta varsinkin silloin kun substraatti on kallista, voitaneen  $3 \times K_m$ -konsentraatiota pitää jo kyllin suurena. Joskus saattaa  $10 \times K_m$ -konsentraatio vaikuttaa jo reaktiota inhiboivasti. Näin on asia esim. pyruvaatin ollessa laktaattidehydrogenaasin substraattina.

Jos määrityksissä joudutaan syystä tai toisesta käyttämään entsyymien saturointiin riittämätöntä substraatin määrää, tulisi saadut tulokset korjata  $K_m$ :n avulla optimikonsentraation välillä saaduiksi arvoiksi.

Monien entsyymien spesifisyys ei ole absoluuttinen, eikä niiden luonnollista substraattia tunneta. Tällöin substraatin valintaa ei usein ratkaise yksinomaan reaktionopeus vaan myös määrittelytekniikan käytännöllisyys, tulosten toistettavuus ja taloudelliset tekijät.

Koentsyymien ja aktivaattorien vaikutus entsyymireaktioon on samantapainen kuin substraatin.

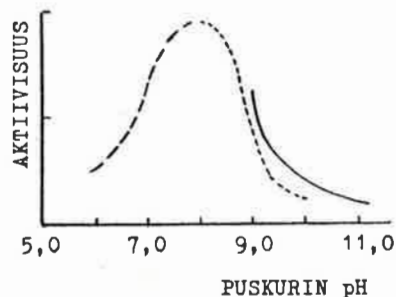
### Puskurin vaikutus

Reaktioseoksen pH:n vakiona pitämiseksi on yleensä välttämätöntä käyttää puskuria. pH vaikuttaa entsyymien ionisaatio-tilaan, mutta myös substraattiin, koentsyymiin, entsyymi-substraattikomplekseihin sekä tasapainotilaan.

Eri entsyymien optimi-pH:t vaihtelevat suuresti ja ne on kaikkien kohdalla tutkittava erikseen.

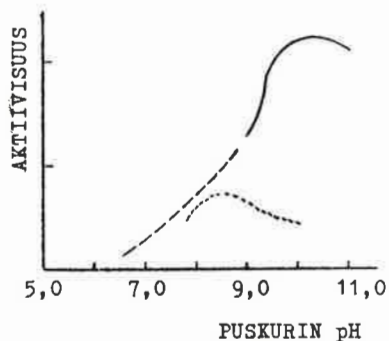
pH:n lisäksi reaktion nopeuteen vaikuttaa suuresti myös puskurin laatu ja ainakin jossain määrin sen ionivahvuuskin. Saman entsyymien katalysoidessa eri suuntaisia reaktioita saattavat sekä puskurin pH- että laatuvaatimukset olla hyvinkin erilaiset. Erinomaisena esimerkkinä tästä on laktaattidehyd-

rogenaasi katalysoidessaan vastakkaisia reaktioita fosfaatti-, boraatti- ja glysiinipuskurissa eri pH:ssa (King, 1965). Boraatti inhiboi sitä, kun substraattina on laktaatti, mutta ei päinvastaisessa suunnassa (kuviot 4 ja 5).



— GLYSIINIPUSKURI  
 --- FOSFAATTIPUSKURI  
 ..... BORAATTIPUSKURI

Kuva 4. Laktaattidehydrogenaasin aktiivisuuden riippuvuus puskurin laadusta ja pH:sta, pyruvaatin ollessa substraattina.



— GLYSIINIPUSKURI  
 --- FOSFAATTIPUSKURI  
 ..... BORAATTIPUSKURI

Kuva 5. Laktaattidehydrogenaasin aktiivisuuden riippuvuus puskurin laadusta ja pH:sta, laktaatin ollessa substraattina.

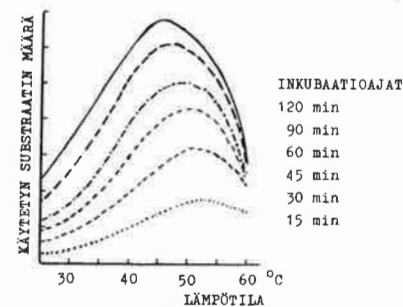
Optimi-pH vaihtelee saman suuntaisissakin reaktioissa substraatista riippuen. Tämä on todettu selvästi mm. alkalisen fosfaatin kohdalla. Entsyymien stabiilisuus ei välttämättä ole paras mahdollinen optimi-pH:ssa, johon sen vuoksi vaikuttavat myös inkubaatioajan pituus ja lämpötila.

Puskuria käsiteltäessä on syytä pitää mielessä, että sen pH muuttuu ionivahvuuden ja lämpötilan muuttuessa ja voi olla esim. 20 °C:ssa huomattavasti erilainen kuin 37 °C:ssa.

Kaiken edellä esitetyn perusteella entsyymiaktiivisuuden riippuvuus puskurista on monitahoinen asia, ja termillä ”optimi-pH” on tietty merkitys vain tarkoin määrättyissä oloissa, joissa on huomioitu puskurin laatu, inkubaatioaika sekä inkubaatiolämpötila.

#### Lämpötilan vaikutus entsyymireaktioon

Lämpötilan kasvaessa entsyymireaktion nopeus kasvaa samoin kuin useimpien muidenkin kemiallisten reaktioiden, mutta entsyymien termalinen inaktivaatio tulee rajoittavaksi tekijäksi. Lämpötilan noustessa lisääntyvät entsyymien aktiivisuuden ohella myös sen inaktivaatio ja denaturaatio, joten inkubaatioajan pituus vaikuttaa suuresti optimilämpötilaan, mitä lyhyempi inkubaatio sitä korkeampi optimilämpötila (kuvio 6; King, 1965).



Kuva 6. Inkubaatioajan pituuden vaikutus entsyymireaktion ”optimilämpötilaan”. Oikealle merkityt inkubaatioajat ovat vastaavien reaktiokuvaajien mukaisessa järjestyksessä.

20–45 °C välillä reaktionopeus kasvaa yleensä 2–3-kertaiseksi 10 asteen nousua kohti, joten useimpien entsyymien lämpötilakerroin ( $Q_{10}$ ) on 1,5–3.

$$\left[ Q_{10} = \frac{\text{Reaktionopeus } (T + 10)^\circ \text{C:ssa}}{\text{Reaktionopeus } T^\circ \text{C:ssa}} \right]$$

Tavallisimpien entsyymien kertoimet voidaan löytää kirjallisuudesta, mutta on muistettava, että kertoimeen ei vaikuta ainoastaan lämpötila vaan myös inkubaatioaika ja olosuhteet, joten se on menetelmästä riippuva.

Entsyymien aktiivisuuteen eri lämpötiloissa vaikuttavat lisäksi entsyymien puhtaus, mediumin pH ja suoja-aineet, kuten albumiini. Tästä johtuen puhdistetun entsyymivalmisteen optimilämpötila on aina matalampi kuin seeruminäytteen, jossa oleva albumiini suojelee inaktivaatiota vastaan.

Lämpötilan muutos vaikuttaa välittömästi kemiallisen reaktion nopeuteen ja entsyymien inaktivaatioon, mutta lisäksi se vaikuttaa entsyymireaktion nopeuteen välillisesti pH:n ja dissosiaation muutosten kautta.

International Union of Biochemistry'n suosituksen mukaan (v. 1964) reaktiolämpötilan tulisi entsyymimäärityksissä olla 30 ° C.

#### *Tulosten vakiointi*

Määrittystulosten vakioinnissa on tiettyjä vaikeuksia. Näytteiden aktiivisuuksia ei voida määrätä tunnettujen entsyymivalmisteiden perusteella. Saatavissa on kyllä runsaasti entsyymivakioita ja kontrolliseerumeita, mutta kokemus on osoittanut, että niiden aktiivisuudet eivät ole kyllin pysyviä. Niiden sijaan vertailuperustana on pidettävä substraatin, koentsyymien tai tuotteiden mitattua muutosta ja aktiivisuudet laskettava havaittujen molaaristen muutosten perusteella.

Koska tuloksia ei voida vakioida ja koska entsyymireaktion nopeuteen vaikuttavat herkästi monet tekijät, on kiinnitettävä erityistä huomiota siihen, että määrittäolosuhteet pysyvät joka kerta samanlaisina. Koesarjojen ohella tulisi päivittäin tutkia myös kaupallinen kontrolliseerumi tai oma tunnettu näyte, jotta havaittaisiin olosuhteiden aiheuttamat merkittävät tulosten muutokset.

#### *Näytteiden valinta ja käsittely*

Kliiniset entsyymimääritykset suoritetaan Suomessa yleisimmin seerumista. Tällöin on varottava hemolyysiä, koska se nostaa sellaisten entsyymien aktiivisuutta, joita on runsaasti punasoluissa, esim. laktaattidehydrogenaasi (LDH), aspartaatti-aminotransferaasi (GOT), aldolaasi ja hapan fosfataasi. Toisaalta hemoglobiini saattaa olla entsyymien inhibiittori, esim. lipaasi.

Plasmaa käytettäessä on sentrifugointi suoritettava kunnolla, ettei mukaan tulisi trombosyyttejä. Tässä yhteydessä on muistettava, että antikoagulantit inhiboivat monia entsyymejä, mutta joissakin tapauksissa ne ovat aktivaattoreita.

Ohimennen mainittakoon, että lääkeaineet saattavat myös vaikuttaa merkittävästi entsyymien aktiivisuuteen ja aiheuttaa joskus vaikeasti selitettäviä tuloksia. Asiaa ei kunnolla tunneta, mutta esim. niiden inhiboiva vaikutus on syytä pitää mielessä.

Näytteitä käsiteltäessä tulee seerumi tai plasma erottaa huolella ja mahdollisimman pian verisoluista, jotta entsyymien virtaus puolin tai toisin ei aiheuta tulosten muutoksia. Veren hyytymistä ja retraktiota ei kuitenkaan tulisi nopeuttaa käytämällä 37 ° C vesihaudetta.

Kliinisessä rutiinistyössä tavallisimmin tutkitut entsyymit ovat lähes kaikki melko hyvin pysyviä, mikä helpottaa näytteiden käsittelyä. Niitä voidaan yleensä säilyttää huoneen lämpötilassa yli yön, ellei jääkaappia ole käytettävissä sekä lähettää postitse muualle tutkittavaksi. Aktiivisuus säilyy muutamia päiviä 0–4 ° C:ssa, mutta pitempään säilytettäessä tulisi näytteet pitää jäädytettynä — 20 ° C:ssa.

Eräät entsyymit vaativat edellä esitetystä poikkeavan käsittelyn. Tällaisia ovat ainakin hapan ja alkalinen fosfataasi, laktaatti- ja isositraattidehydrogenaasi sekä ulosteen trypsiini. Viimemainittu lienee huonosti pysyvä ja se tulisi tutkia mahdollisimman pian, ellei näytettä jäädytetä. Asiaa ei tosin tunneta aivan varmasti.

Hapan fosfataasi säilyy huonosti huoneen lämpötilassa ja erittäin huonosti jos se on alkalisessa ympäristössä. Soluista erotetun seerumin pH nousee huomattavasti. Sen vuoksi voidaan hapanta fosfataasia säilyttää huoneen lämmössä lyhyitäkin aikoja vain, jos seerumia ei eroteta soluista tai sen pH madalletaan lisäämällä esim. etikkaa. Seerumin seistessä solujen yhteydessä voi punasoluista lähtöisin oleva hapan fosfataasi lisääntyä, mutta kliinisessä työssä on tutkimuksen kohteena yleensä tartraattilabiili entsyymi, jonka säilymistä seerumissa punasolut auttavat. Jäädytettynä hapan fosfataasi säilyy hyvin.

Alkalinen fosfataasi säilyy niinkään jäädytettynä erinomaisesti, mutta huoneen lämpötilassa tai 0–4 ° C:ssa sen aktiivisuus seerumissa saattaa nousta ensimmäisen vrkn aikana, laskien seuraavina päivinä takaisin. Tämä on todettu ainakin Bessey-Lowry'n menetelmää käytettäessä. Nousun arvellaan johtuvan seerumin alkalisuudesta, joten tässäkin tapauksessa olisi parasta antaa seerumin olla verihyytymän päällä, mikäli määrittäminen tehdään näytteenottopäivänä.

Jäädyttäminen auttaa yleensä entsyymiaktiivisuuden säilymistä, mutta tässäkin tapauksessa sääntö ei jää ilman poikkeusta. Tunnetusti on ainakin kaksi entsyymiä, joita jäädyttäminen muuttaa, nim. isositraatti- ja laktaattidehydrogenaasi. Edellisen aktiivisuuden on todettu laskevan. Jälkimmäisen

kohdalla ovat tutkimustulokset jossain määrin ristiriitaisia. Tiedetään, että jäädyttäminen muuttaa sen isoentsyymien kokoonpanoa (Levonen, 1967), joten isoentsyymejä määritettäessä näytettä ei saa jäädyttää. Entsyymien totaaliaktiivisuuskin näyttää alentuvan matalissa lämpötiloissa useammin kuin huoneen lämmössä. Tämän perusteella tulisi kyseinen entsyymi tutkia kohta näytteen oton jälkeen tai, jos sitä on pakko säilyttää, pitää se huoneen lämmössä tai korkeintaan tavallisessa jääkaapissa, mikäli pelätään infektiota. Säilyvyys riippuu todennäköisesti isoentsyymien suhteista ja siten vaihtelee eri näytteiden kohdalla. Laktaattidehydrogenaasia määritettäessä tulee myös muistaa, että NADH muodostaa jäädytettynä sen inhibiittoreita.

Kliinisten laboratoriodien entsyymimäärityksissä on nykyisin paljon korjaamisen varaa. Käytössä on yhä menetelmiä, joissa reaktio-olosuhteet tunnetusti eivät ole optimaaliset eikä kinetiikan asettamia rajoituksia ole kylliksi huomioitu. Näinkin saaduista tuloksista on tosin apua diagnostiikassa sekä hoidossa, ja niihin on yleisesti totuttu. Tulokset saattavat kuitenkin olla karkeastikin virheellisiä, eikä niitä voida verrata muilla menetelmillä saatuihin aktiivisuuksiin. Tämän vuoksi menetelmät olisi korjattava sekä huolehdittava siitä että entsyymien määrityksissä koe-olosuhteet pysyvät kerta kerralta muuttumattomina, näytteet otetaan ja säilytetään asiallisesti ja aktiivisuuden mittana pidetään reaktion optimoissa havaittavaa alkunopeutta.

#### Kirjallisuus

1. Bowers, G. N. Jr., Kelley, M. L. & McComb, R. B. (1967), Clin. Chem., 13, 595.
1. Dixon, M. & Webb, E., (1964) Enzymes, Longmans, London.
3. Dybkaer, R. & Jørgensen, K. (1967) Quantities and Units in Clinical Chemistry, Munksgoörd, Copenhagen.
4. Enzyme Nomenclature (1964) Elsevier Publishing Company, Amsterdam.
5. Henry, R. J. (1964) Clinical Chemistry, Hoeber & Row Publishers, New York.
6. King, J. (1965) Practical Clinical Enzymology, D. van Nostrand Company Ltd, London.
7. Levonen, E. (1967) Suomen Kemistiseuran Tiedonant. 76.
8. Mäkinen, K. (1967) Suomen Kemistiseuran Tiedonant. 76.
9. Richterich, R. (1965) Klinische Chemie, S. Karger Basel.

## Kudoksenäytteiden entsyymihistokemiallisesta tutkimuksesta\*

L. Kalevi Korhonen

Turun yliopiston anatomian laitos/Helsingin yliopiston II patologian laitos

Elävä olento, sen elin tai yksittäinen solu ei ole vain keittopullo, jossa mielivaltaisesti sekoittuneet aineet reagoivat keskenään. Jokaisessa solussakin on molekulaaritasolle asti ulottuva mikroarkkitehtuuri. Soluorganellien ja solunsisäisten kalvojen rajaamina kemialliset reaktiot tapahtuvat näiden proteiini- ja lipidikalvojen läpi tai niiden pinnalla, jolloin reaktioita saattavat hallita lait, jotka poikkeavat vesiliuoksissa havaituista.

Biologiassa etsitään vastausta kolmeen kysymykseen: mitä tapahtuu, miten tapahtuu ja missä tapahtuu. Biokemia ja fysiologia tutkivat kahta ensimmäistä kysymystä, kolmatta kuvaa morfologia. Tutkimuksen edistyessä osoittautui, että solujen rakenneosien kemiallisen luonteen tunteminen on välttämätöntä elintoimintoja tulkittaessa. Tällaiseen tutkimukseen on tarjolla kolme mahdollisuutta:

1) Eristetään makroskaalassa solun osia ja tutkitaan niiden kemiaa. Tällaisia homogenaattien ultrasentrifugitutkimuksia käyttämällä ei kuitenkaan voida selvittää kudosten eri solutyypin ominaisuuksia. Esimerkiksi maksa, jota näissä tutkimuksissa eniten käytetään, sisältää 7—10 eri solutyyppeä (maksan parenkyymisolut, verisuonten endoteeli, sileä lihas, fibroblastit, sappitiehiden solut, sidekudoksen "irtosolut" ja veren eri solutyypit), ja maksan parenkyymisolutkin poikkeavat toisistaan sekä toiminnaltaan että ominaisuuksiltaan, kuten helposti ymmärtää jo niiden suuresti toisistaan poikkeavia verenkierro-olosuhteita tarkastelemalla.

2) Toinen mahdollisuus on eristää pieniä homogeenisia soluryhmiä, yksittäisiä soluja tai suurempien solujen osia, ja suorittaa näistä mikroanalyyskejä. Tässäkin on tutkimuksen rajana se, kuinka puhtaana materiaali pystytään eristämään. Analyttinen menetelmä tuskin asettaa rajoja, kun muistamme, että Lowryn kehittämällä "enzymatic cycling" menetelmällä

\* Esitelmä Kemian Päivien klinisen biokemian symposiumissa Helsingissä 26. 10. 68.

*Taulukko 1.* Entsyymiaktiiviteitin säilyminen prosentteina alkuperäisestä eri fiksaatioiden jälkeen. (Yhdistetty tutkimuksista: Danielli 1946, Jannigan 1965, Korhonen 1966, Korhonen ja Hyyppä, Julkaisematon, Seligman 1951, Stafford ja Atkinson 1948, Pearse'n 1960 mukaan)

Entsyymi	Formaldehydi + 4 °C	Glutar-di-aldehydi + 4 °C	Hydroksiadiip. aldehydi + 4 °C	Asetoni 0 °C	Asetoni ja paraffiiniin valaminen
"Alkaalinen fosfataasi"	75 / 4 t. 26 / 24 t.	—	—	70 / 24 t.	30
"Hapan fosfataasi"	80 / 4 t.	16 / 6 t.	83 / 6 t.	20 / 24 t.	6
Epäorgaaninen pyrofosfataasi	50 / 24 t. 25 / ½ t.	12 / 24 t. 9 / ½ t.	78 / 24 t. 30 / ½ t.	97 / ½ t. 30 / ½ t. 54 / ½ t.	ilman pesua pesty puskurissa asetaldehydissä
Ei-spesiifiset esteraasit	80 / 4 t.	35 / 6 t.	—	—	10
Kolmiesteraasi	35 / 24 t.	—	—	—	0
Lipaasi	(10 / 4 t. ?)	—	—	—	5
Sulfataasi	75 / 4 t. 75 / 4 t. 58 / 24 t.	—	—	—	0
Beta-glukuronidaasi	85 / 4 t. 84 / 24 t.	—	—	—	—
Fosfoamidaasi	75 / 4 t.	—	—	—	—
Sytokromioksidaasi	0	—	—	20 / 24 t. jälkiä	5
Meripihkahappodehydrogenaasi	0	—	—	60 / 24 t.	0
Karboanhydraasi	10 / 24 t.	—	30 / 24 t.	—	0

on mitattu jopa  $10^{-16}$  M suuruisia määriä biologisesti mielenkiintoisia aineita, ja teoreettinen menetelmän raja on  $10^{-19}$  M ainemäärästä suoritettu analyysi.

3) Histokemiassa pyritään kemiallisesti määriteltyjen aineiden ja reaktioiden mikroskooppiseen tutkimukseen kudosleikkeissä, käyttäen tunnettuja kemiallisia osoitusreaktioita.

Seuraavassa tarkastelemme histokemiallista entsyymitutkimusta siinä järjestyksessä, missä työ käytännössä tehdään: näytteen esikäsittely, toiseksi histokemiallisen reaktion suoritus, ja kolmanneksi tuloksen tulkinta.

Valomikroskooppista tutkimusta varten kudosleikkeen on oltava noin 2/1 000—10/1 000 mm paksuinen, ja elektroni-mikroskopiaan käytettävän leikkeen paksuus on 1/10 000 mm luokkaa. Morfologisten yksiköiden välillä on oltava riittävästi kontrasteja, ja histokemiallisen reaktion tuloksen on erotuttava selvästi ympäristöstään. Näytteen käsittelyn on täytettävä muutama yksinkertainen periaate:

a) Käsittely ei saa vaikuttaa tutkittavan aineen kemialliseen rakenteeseen, ei sen lokalisaatioon solussa, eikä aineen määrään.

b) Kudoksen rakenteen ja mittasuhteiden on pysyttävä muuttumattomina.

On heti todettava, että näitä ehtoja ei voida yht-aikaa täyttää, vaan on tyydyttävä sovitteluratkaisuihin.

Perusluonteeltaan morfologisena tutkimuksena pyritään histokemiassa kuvaamaan erästä hetkellistä tilaa kudoksessa. Sen vuoksi elintoiminnat on nopeasti ja yht'aikaisesti katkaistava, mikä tapahtuu joko jäädyttämällä tai fiksoimalla.

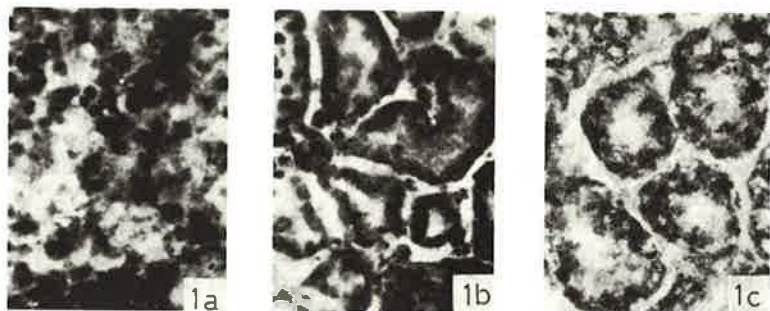
Fiksaation ("kiinnittäminen") tarkoituksena on toisaalta kovettaa kudosta, jotta leikkeiden valmistus onnistuisi, toisaalta pysäyttää kemialliset tapahtumat näytteessä ja sitoa aineet paikoilleen, ennenkaikkea varovaisesti valkuaisaineita saostamalla ja polymeroimalla. Koska entsyymihistokemiassa on entsyymiproteiiniin denaturaatiota vältettävä, voidaan kemiallista fiksaatiota käyttää vain rajoitetusti. Kuten taulukosta 1. nähdään, vaihtelee kemiallisen fiksaation vaikutus suuresti, riippuen siitä, mitä ainetta käytetään, tai mitä entsyymiä tarkastellaan.

Koska kemiallinen fiksaatio aiheuttaa aina entsyymiaktiiviteetin vähenemistä, otaksuisi tuoreiden käsittelemättömien leikkeiden käytön olevan edullisempaa. Näissä kuitenkin morfologiset yksityiskohdat säilyvät huonosti, ja leikkeiden valmistus on vaikeaa. Osa entsyymeistä saattaa olla lisäksi liukoissa 1. lyo-muodossa, jolloin ne diffundoituvat inkubaationesteeseen (taulukko 2.). Ainoastaan sidottu eli ns. desmo-muoto entsyymistä on tällöin jäljellä ja voidaan histokemiallisesti osoittaa. Fiksaatiolla voidaan ainakin osa lyo-muodosta kiinnittää soluihin (kuva 1, 2).

Taulukko 2. Desmo-muodossa (ei diffundoitavana) olevan entsyymikatiiviteetin osuus prosentteina kokonaisaktiiviteetista fiksoimattomissa kudosteikkaisissa.

(Nachlas 1956, Hannibal ja Nachlas 1959, Pearsen 1960 mukaan)

Ei-spesiifiset esteraasit	30
"Alkaalinen fosfataasi"	61
"Hapan fosfataasi"	48
Beta-naftylamidaasi	65
Beta-glukuronidaasi	5



Kuvat 1 a-c. Epäorgaaninen pyrofosfataasi I rotan munuaisessa, kuvista nähdään fiksaation vaikutus. 1 a on fiksoitu asetonissa, jolloin entsyymi saostuu reversiibelisti, ja diffundoituu inkubaation aikana, aiheuttaen voimakkaan tumien värjäytymisen. 1 b on fiksoitu hydroksiadipaldehydissä, jonka jälkeen diffundoituminen on vähäistä. 1 c on fiksoitu asetaldehydissä, jolloin entsyymiaktiiviteettiä todetaan ainoastaan syttoplasmassa, tumien ollessa negatiiviset. Tämä vastaa ultrasentrifugifraktioidilla saatua tulosta tämän entsyymin lokalisaatiosta.



Kuvat 2 a-c. Epäorgaaninen pyrofosfataasi I rotan sydämessä. 2 a fiksoitu asetonissa, jolloin entsyymi on edelleen liukoinen ekstrahoituen inkubaationesteeseen. 2 b on fiksoitu hydroksiadipaldehydissä, lokalisaatio parempi. 2 c on fiksoitu asetaldehydissä, jolloin todetaan terävä lihaksen poikkijouvaisuutta vastaava lokalisaatio, mikä vastaa myös varsin läheisesti ATP-aasiaktiiviteetin lokalisaatiota. 2 b leike vaati myös pitemmän inkubaatioajan, vastaten kvantitatiivista mittausta aldehydien aiheuttaman inaktivaation asteesta (vrt. taulukko 1).

Klassillisessa histologiassa valmistetaan mikroskopiassa käytetyt ohuet leikkeet paraffinilla tai muovilla kyllästetyistä kudostenäytteistä, jolloin kudos leikkautuu kyllästysaineen mukana. Kyllästäminen edellyttää useiden kemikaalien ja korkeiden lämpötilojen käyttöä, jotka tuhoavat entsyymiaktiiviteetin melkein kokonaan. Tämän vuoksi entsyymihistokemiassa leikkeet valmistetaan jäädytetystä kudoksesta jäädytystilaan sijoitetulla ns. kryostaattimikrotomilla, noin  $-20^{\circ}\text{C}$  lämpötilassa. Kudoksen vesi korvaa jäätyneenä infiltroimiseen käytetyt aineet. On tärkeää jäädyttää näyte nopeasti riittävän alhaiseen lämpötilaan. Hitaasti jäädytettäessä syntyy suuria kiteitä, jotka rikkovat hienorakenteen, ja lisäksi nolla-asteen lähellä voi tapahtua aineenvaihtotuotteiden rikastumista, kun entsyymien aktiiviteetit vähenevät eri nopeuksilla.

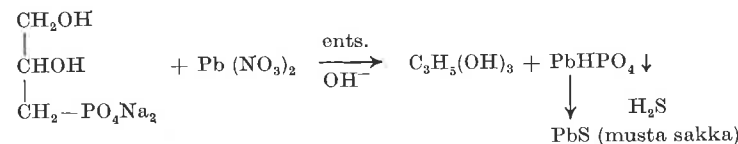
Biokemistien käyttämä freezing-drying, jäädytys-kuivausmenetelmä soveltuu myös entsyymihistokemiaan. Oikein järjestetyissä olosuhteissa säilyy kudoksen morfologia erinomaisesti, ja useimpien entsyymien aktiiviteetti ei muutu lainkaan. Varsinaista fiksaatiota ei kuitenkaan tapahdu, vaan liyomuotoiset entsyymit voivat edelleen diffundoitua vesiliuoksiin.

Olettakaamme nyt, että meillä on sopivalla tavalla valmistettu kudosteike, josta ryhdymme histokemiallisesti osoittamaan entsyymiaktiiviteettiä. (Taulukko 3).

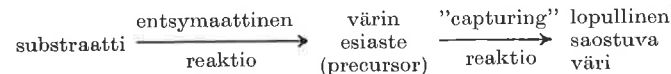
Taulukko 3. Entsyymihistokemiallisten menetelmien pääperiaatteet

Taulukossa olevat esimerkit käytetyistä reagensseista ovat yleensä nykyään korvattu mutkikkaammilla yhdisteillä, joilla liukoisuus ym. ominaisuudet ovat edullisemmat. Reaktioperiaatteet ovat kuitenkin samat.

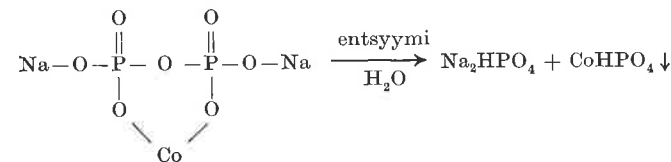
1. Metallisuolamenetelmät



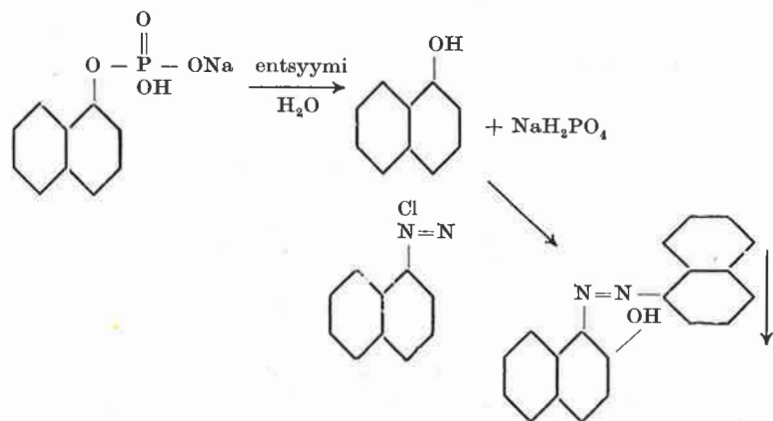
Yleinen reaktiokaava:



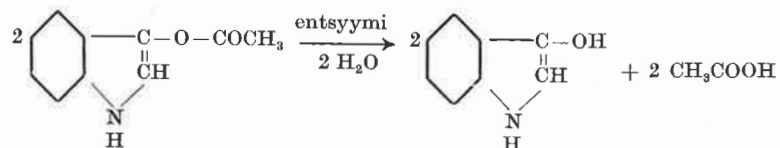
Kelaattimenetelmä



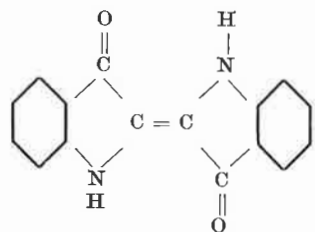
2. Atsovärimenetelmät



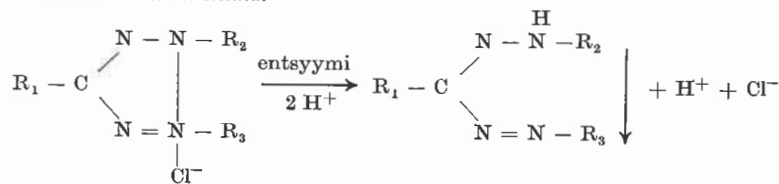
3. Indoksyylimenetelmät



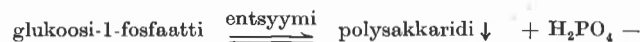
hapetus



4. Tetratsoliummenetelmät



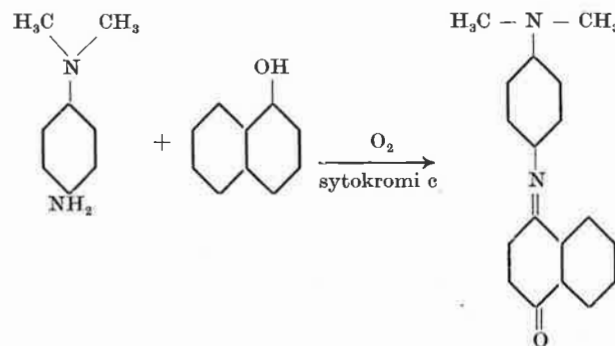
5. Synteettiset menetelmät



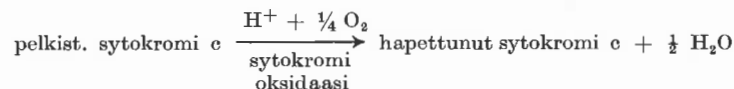
6. Substraattifilmimenetelmät

7. Immunohistokemialliset menetelmät

8. Muut menetelmät, esim. sytokromioksideasin osoittaminen



+ 2 H<sub>2</sub>O + 4 pelkist. sytokromi C



Gomorin ja Takamatsun toisistaan riippumatta esittämässä metallisuolamenetelmässä inkuboidaan leikkeitä puskuriliuoksessa, jossa on substraattia ja kaksiarvoinen metalli (capturing anion). Entsyymaattisessa hydrolyysissä vapautunut kationi saostuu metallisuolanaan entsyymiaktiiviteetin alueelle. Tämän menetelmän muunnelmaksi voidaan käsittää Bergin (1965) ja Korhosen (1966) esittämä menetelmä, jossa substraattina on metallikelaatti.

Atsovärimenetelmän esittivät Menten, Junge ja Green 1944. Substraattina on monoaryyli, josta entsyymaattisesti vapautunut alkoholiosa liittyy diatsosuolaan, saostuen värillisenä yhdisteenä.

Indoksyylimenetelmän ovat esittäneet Barnet ja Seligman (1951) sekä Holt (1952). Entsyymaattisesti vapautunut indoksyyli hapetetaan saostuvaksi indigoväriksi.

Tetratsoliumreduktioa voidaan käyttää dehydrogenaasi ja diaforaasiaktiiviteetin osoittamiseen. Entsyymi aktivoi substraatin vetyatomien, jonka akseptorina on vesiliukoinen tetratsolium. Tämä pelkistyy saostuvaksi formatsaaniksi.

Synteettistä menetelmää käyttäen voidaan tutkia esim. fosforylaasiaktiiviteettia, perustuen entsyymien syntetisoiman uuden polysakkaridin osoittamiseen.

Substraattifilmimenetelmän on kehittänyt Daoust 1957. Substraatti luotetaan gelatiiniin, jonka jälkeen osoitetaan hajoamatta jäänyt substraatti sopivalla värjäyksellä. Lokalisatio on luonnollisesti karkea, kuitenkin parempi kuin uskaltaisi odottaa.

Immunohistokemiallisissa menetelmissä käytetään puhdistettua entsyymiproteiinia vastaan muodostettua antibodia, joka fluorisoivaan väriaineeseen liitettynä osoittaa kudoksessa spesifisesti yhden entsyymiproteiinin, kun taas muut menetelmät osoittavat entsyymiaktiiviteettia.

Luonnollisesti on vielä joukko "muuta menetelmiä" jotka eivät mahdu edellä kuvattuun jaoitteluun, kuten sytokromioksideasin, tyrosinaasiaktiiviteetin ym. osoittaminen.

Elektronimikroskopiaa varten ovat Seligman ym. kehittäneet uusia —SH ryhmiä sisältäviä substraatteja. Nämä reagoivat entsyymaattisen hydrolyysin jälkeen osmiumteroksidin kanssa, jolloin muodostuu hienojakoista osmiumdioksidia. Tämä näkyy hyvin myös valomikroskoopissa, ja on ihanteellinen elektronimikroskopiaa varten. Myös muita menetelmiä, joissa reaktiotulos sisältää sopivaa raskasmetallia, voidaan käyttää elektronimikroskopiassa.

Tarkastelkaamme seuraavaksi eräitä histokemiallisten reaktioiden tulkinnessa muistettavia seikkoja.

Jos histokemiallisesti ei pystytä osoittamaan entsyymiaktiiviteettia määrättyssä kudoksosassa, ei tämä vielä sulje pois mahdollisuutta, etteikö sitä esiintyisi pieniä määriä. Pienin entsyymiaktiiviteetin määrä, mikä pystytään osoittamaan histokemiallisesti, riippuu entsyymimolekyylien määrästä ja turnover luvusta tietyssä kudoksen volyymissä, sekä histokemiallisen menetelmän herkkydestä. Tätä saattavat alentaa seuraavat tekijät.

Fiksaatiota käytettäessä uhrataan osa entsyymiaktiiviteetistä, jotta jäljelläolevan lokalisaatio saataisiin tarkemmaksi. Kysymystä, onko tämä aina perusteltu toimenpide, käsittelemme myöhemmin. Käytetty substraatti saattaa olla hitaasti hydrolysoituva tai niin huonoliukoinen, ettei optimaalista substraattikonsentraatiota saavuteta. Eräissä menetelmissä on inkubaatioliuoksen labiilisuuden vuoksi käytettävä optimaalisesta poikkeavaa lämpötilaa tai pH arvoa. Histokemiallisissa menetelmissä tarvittavista reagensseista saattaa jokin olla entsyymin inhibiittori, kuten raskasmetalli tai diatsosuola.

Histokemiallisesti todettavaan entsyymiaktiiviteetin lokalisaatioon vaikuttavat entsyymien diffuusio, primäärisen reaktiotuloksen ja lopullisen reaktiotuloksen diffuusioidet.

Entsyymien diffuusiota voi tapahtua solun sisällä tai aktiivisesta solusta lähiympäristöön. Inkubaationesteeseen diffundoinut entsyymi voi puolestaan absorboitua uudelleen kudoksenäytteeseen, kohtaan, jossa aluperin ei aktiiviteettia ollut. Diffuusioilmiöiden kuvaamiseksi luotiin käsitteet lyo- ja desmoentsyymi. Ne ovat ilmeisesti saman entsyymien molekyyli-variantteja, joilla erilaisen liukoisuuden lisäksi on muitakin eroja. Fiksaatiolla pyritään diffuusion aiheuttamat virheet estämään (kuvat 1 ja 2). Voidaan tosin väittää, että fiksaatiossa onkin vain ekstrahoitu tai tuhottu selektiivisesti jokin diffuusiivisesti levinyt entsyymimuoto, jolloin lokalisaation paraneminen on vain näennäistä. Näin onkin osoitettu tapahtuvan esim. eräiden esteraasien fiksaatiossa.

Primäärisen ja sekundäärisen reaktion on noudatettava "zero order" kinetiikkaa, jotta reaktiotulos tietyssä kudosalueessa olisi verrannollinen samassa tilavuudessa olevaan entsyymimäärään. Tätä varten on sekä substraatin että "capturing" reagenssin päästävä nopeasti ja riittävän korkeissa konsentraatioissa kudokseen. Reagenssien on oltava riittävän vesiliukoisia, jotta inkubaationesteeseen saadaan tarpeellinen konsentraatio. Toiseksi niillä on oltava alhainen molekyylipaino ja heikko polariteetti, niin että ne pääsevät solukalvojen läpi. Holtin ja Sullivanin tutkimusten mukaan tulee diffuusiovakion olla suurempi kuin  $10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  ja senvuoksi molekyylipainon alle 1000. On edelleen muistettava, että diffuusio kudoksen polysakkarideissa ja proteiineissa saattaa olla jopa  $10^4$  kertaa pienempi kuin vesiliuoksessa.

Jos substraattikonsentraatio on entsyymiaktiiviteetin alueella riittävän suuri, on entsyymaattinen reaktio "zero order" tyyppiä. Primäärisen reaktiotuloksen konsentraatio on oletettavasti aina alhainen, joten ei ole yleensä vaikeuksia nostaa sekundäärireaktion "capturing" reagenssin konsentraatio niin korkeaksi, että tämäkin reaktio on "zero order" tyyppiä. Atsovärimenetelmiä tutkiessaan Pearse, Defendi ja Nachlas ovat tutkineet naftolien ja diatsosuolujen reaktionopeuksia joiden huomataan riippuvan reaktiomiljöön pH arvosta, mikä siis myös on otettava huomioon.

Tarkka entsyymihistokemiallisen reaktiotuloksen lokalisaatio perustuu ennenkaikkea reaktiotuloksen hitaaseen diffuusioon, "capturing" reaktion riittävään nopeuteen ja lopullisen reaktiotuloksen huonoliukoisuuteen. Entsyymireaktion nopeuden merkitys riippuu muiden reaktioiden luonteesta. Esim. metallisuolamenetelmässä on eduksi suuri entsyymireaktion nopeus, sensijaan atsovärimenetelmässä on hitaampi entsyymireaktio edullisempi. Väärä lokalisaatio voi johtua myös muista tekijöistä kuin edellämainitut. Reaktiotulosten odottamaton affiniteetti substraattiin tai muuhun läsnäolevaan aineeseen voi

aiheuttaa entsyymiaktiiviteetista riippumatonta värjäätymistä. Tästä ovat esimerkkinä tumajyväsien värjäätymisen metallisuolamenetelmässä, ja atsovärien affiniteetti lipideihin. Myös spontaani tai bakteerihydrolyysi voivat häiritä lopputuloksia. Asianmukaisia kontrollitutkimuksia tekemällä voidaan nämä virhelähteet yleensä sulkea pois.

Edellä kuvattuja periaatteita noudattamalla voidaan kudoseleikkeissä kuvata määrätyn substraatin entsyymattista hydrolyysiä. Useihin tarkoituksiin tämä on riittävä havainto. Tarkempia tuloksia tarvittaessa on myös selvitettävä, mikä entsyymi todella aiheuttaa tutkitun reaktion. Tähän tuskin tarjoutuu historioemiallisia mahdollisuuksia, vaan on turvauduttava tavanomaisiin biokemian fraktiointimenetelmiin, ja tutkittava sitten entsyymien vaikutusta käytettyyn substraattiin. On osoittautunut monissa tapauksissa, että useat entsyymit vaikuttavat samaan substraattiin. Mikäli silloin halutaan historioemiallisesti tutkia vain yhtä määrättyä entsyymiaktiiviteettiä, on joko kehitettävä spesifinen substraatti tai inhibiittorein estettävä muiden entsyymien toiminta.

Historioemiallinen tutkimus on periaatteessa kvalitatiivista ja deskriptiivista, josta kvantitatiivinen informaatio puuttuu. Reaktiotuloksen värin intensiteettiä käytetään usein mittana entsyymiaktiiviteetista. Tällöin on tietysti ensin tutkittava, että reaktiotuloksen määrä on todella suhteessa entsyymiaktiiviteettiin. Mikrofotometrisesti suoritettu absorptiomittaus antaa silloin varsin hyviä tuloksia, esim. happamen fosfataasin suhteen täysin biokemiallisia mikromäärityksiä vastaavia. Kvantitoimimahdollisuuksia on muitakin. Esim. reaktiotulos voidaan ekstrahoida leikkeestä ja mitata, tai suorittaa joka toisesta leikkeestä historioemiallinen, joka toisesta biokemiallinen mikroanalyyysi. Kehittäen edelleen Bendittin ja Arasen esittämää menetelmää, Hopsu ja McMillan (1965) totesivat, että mittamalla aika, mikä kuluu ensimmäisen valomikroskoopissa näkyviin tulevan reaktion ilmestymiseen, voidaan reaktionopeus mitata niin tarkasti, että saadaan laskettua Michaelin vakio ja muita karakteristikoita täysin tyydyttävällä tarkkuudella.

Biologisista ilmiöistä tehtyjen havaintojen tulkinnassa saattaa syntyä virheitä sekä historioemiallisia havaintoja väärin tulkittaessa, sekä sen vuoksi, ettei tarjolla olevia historioemiallisia mahdollisuuksia ole käytetty hyväksi. Eräänä esimerkkinä mainittakoon biokemiallisesti mitattavissa oleva happamen fosfataasin aktiiviteetin lisääntyminen degeneroituvassa hermossa. Historioemiallisesti voidaan varsin yksinkertaisesti todeta, että aktiiviteetti liittyy retikuloendoteliaalisoluihin, histiosyytien ja makrofagien osallistuessa degeneraatioprosessiin. Historioemiallisesti voidaan yksinkertaisella menetelmällä osoittaa, että havaittu muutos onkin muuttuneen solupopulaation indi-

kaattori, eikä kuvaa itse myeliinitupen katabolismia. Vastavasti yksinomaan historioemiallisiin havaintoihin nojaaminen on harhaanjohtavaa. Esimerkkinä olkoon tavallinen sanonta puhua määrätystä entsyymiaktiiviteetista, vaikka tarkempaa olisi puhua havaitusta substraatin hydrolyysistä, ellei substraattispesifisyyttä ole huolellisesti selvitetty. Historioemiallisessa tutkimuksessa ovat, — ainakin niin toivotaan —, kaikki kudonäytteessä alunperin olleet aineet läsnä, toisin kuin biokemiallisessa tutkimuksessa, joka useimmiten aloitetaan tutkittavan aineen puhdistamisella.

Yleinen käsitys, että historioemia yhdistää morfologisen ja biokemiallisen tutkimuksen on mielestäni harhaanjohtava. Se on tosin syntynyt tarpeesta yhdistää kemiallinen ja morfologinen tieto, mutta on nykyisellään vielä eräänlaista kemiallista morfologiaa. Historioemia lisää erään uuden dimension morfologiseen tutkimukseen, mutta sillä on edelleen morfologian staattinen luonne. Historioemiallisin menetelmin voidaan kuvata vain pieni muru biokemian detalleista, eikä nykyisin menetelmin päästä biokemiassa saatavaan dynaamiseen kuvaan metabolismista. Samoin historioemia pystyy selvittämään vain osan tavanomaisen morfologisen tutkimuksen detalleista. Mutta harkitusti sovellettuna sekä biokemiallisen ja morfologisen tutkimuksen tueksi se kuitenkin tuo esille uusia näkökohtia biologisista probleemoista.

Erityisesti nykyään kun tutkimus siirtyy molekulaaribiologi- sille tasolle, olisi pyrittävä kehittämään myös historioemialliset menetelmät näitä vaatimuksia vastaaviksi tarkkuudeltaan. Arvelisin, että juuri spesifisten reaktioiden kehittämisessä ja reaktiokinetiikan tutkimisessa biokemisti ja kemisti voisivat raivata uusia alueita myös historioemiallisen tutkimuksen käyttöön.

#### Kirjallisuutta:

##### Yleiskatsauksia:

1. *Barka, T. ja Anderson, P. J.*: Histochemistry, theory, practice and bibliography. Hoeber med. div. N.Y. 1965.
2. *Grauman, W. ja Neumann, K.*: Handbuch der Histochemie, Bd. VII/1. G. Fischer Verl. Stuttgart 1960.
3. *Pearse, A. G. E.*: Histochemistry, theoretical and applied. Churchill Ltd. London 1960.

##### Muita tutkimuksia:

1. *Barnett, R. J. ja Seligman, A. M.*: Histochemical demonstration of esterases by production of indigo. *Science* **114**: 579, 1951.

2. *Berg, G. G.*: The staining of triphosphatases by the chelate removal method. *J. Histochem. Cytochem.* **12**: 341, 1965.
3. *Daoust, R.*: The substrate film method in enzyme histochemistry. *Exp. Cell Res. Suppl.* **7**: 40, 1959.
4. *Holt, S. J.*: A new principle for the histochemical localization of hydrolytic enzymes. *Nature* **169**: 271, 1952.
5. *Holt, S. J.* ja *O'Sullivan, D. G.*: Studies in enzyme cytochemistry I. Principles of cytochemical staining methods. *Proc. Roy. Soc. B.* **148**: 465, 1958.
6. *Hopsu, V. K.* ja *McMillan, P. J.*: Quantitative characterization of a histochemical enzyme system. *J. Histochem. Cytochem.* **12**: 315, 1964.
7. *Korhonen, L. K.*: Studies on the histochemical demonstration of inorganic pyrophosphatase activity. *Ann. Acad. Scient. Fenn., A, Medica* **124**, 1966.
8. *Pearse, A. G. E.*: The future of academic and applied enzyme histochemistry. II internat. congress of histo- and cytochem., Springer Verl. Berlin 1964, 22.
9. *Seligman, A. M.*: Some recent trends and advances in enzyme histochemistry. II internat. congress of histo- and cytochem., Springer Verl. Berlin 1964, 9.

## Ny analysvåg



### SAUTER ANALYSVÅG 414

En objektivt exakt och snabbt avläsbar digitalskala. 6 mm gradindelning möjliggör ett exakt angivande av mätresultatet medels mikrometer; i makrovågen med 1/10 mg precision och i halv-mikrovågen 1/100 mg

precision. Vågens bärande delar är av brännlackerad lättmetall. För uppnående av bättre värmeisolering är fodralets lock av konsthartharts. Lätthanterliga reglerelement. Vågskålen och mätskalan går att samtidigt kontrollera. Stort, genom förskjutbara glasväggar isolerat vägningstrymme.

Vi levererar gärna prospekt och offerter.  
Importör och generalagent:

oy **apta** ab

Nilsjägatan 6-8, Helsingfors 51  
Växel 70 877

Tillverkare:  
August Sauter KG.  
747 Ebingen/Württ.

# LABORATORIO- TUTKIMUKSIA

Yhtyneet Kliiniset Laboratoriot Oy  
— De Förenade Kliniska Labora-  
torierna Ab

Helsinki 12, Fredrikinkatu 20 A II kerros

Avoimna klo 8,00–19,00  
pyhäaattoina klo 8,00–13,00

## Puhelimet

Vaihde .....	13 388
toim. joht. <i>Pauli Merikallio</i> myös suoraan .....	652 475
teknill. joht. <i>Esteri Kalervo</i> myös suoraan .....	637 520

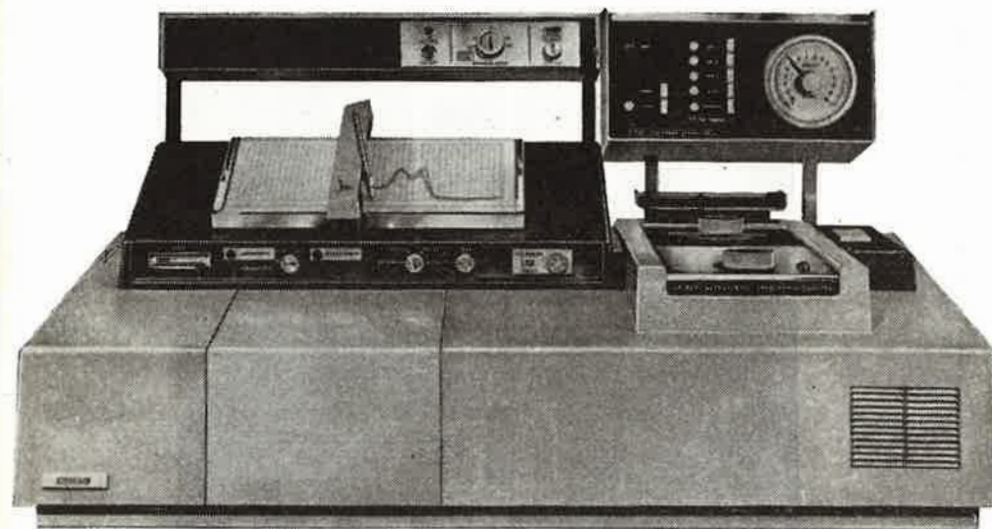
## Suorittaa

- hormonitutkimuksia (dos. *Elja Pitkänen*)
- irtosolututkimuksia (prof. *Lauri Saxén* ja *Sakari Timonen*)
- kliinisen kemian tutkimuksia (fil. kand. *Ra-  
kel Karttunen*)
- serobakteriologisia tutkimuksia (tri *Olli-  
Veikko Renkonen*)
- veriryhmä (ABO + Rh)-tutkimuksia (tri *Sirkka Kontiainen*)

## SP.800

spectrophotometer  
for routine U.V. analysis

with automation accessories



*Save operator time, increase speed and  
efficiency with Unicam automation for:*

**ENZYME REACTION RATES**  
**LIQUID COLUMN CHROMATOGRAPHY**  
**ALL ROUTINE ULTRAVIOLET AND  
VISIBLE SPECTROSCOPY**

*Please send for descriptive brochure.*

The brilliant new Unicam SP. 800 Spectrophotometer is setting new standards in ultraviolet and visible Spectroscopy. The widely acclaimed flat bed presentation, the beam balance smoothing cam and the unique second sample position are among the features which establish it as *the* outstanding U.V. spectrophotometer. Additionally, Unicam now offers automation equipment which provides:  
AUTOMATIC interchange of up to 4 sample and 4 reference cells  
AUTOMATIC re-cycling over any preselected wavelength range  
AUTOMATIC recordings at predetermined time intervals.

## Unicam Precision Spectrophotometers

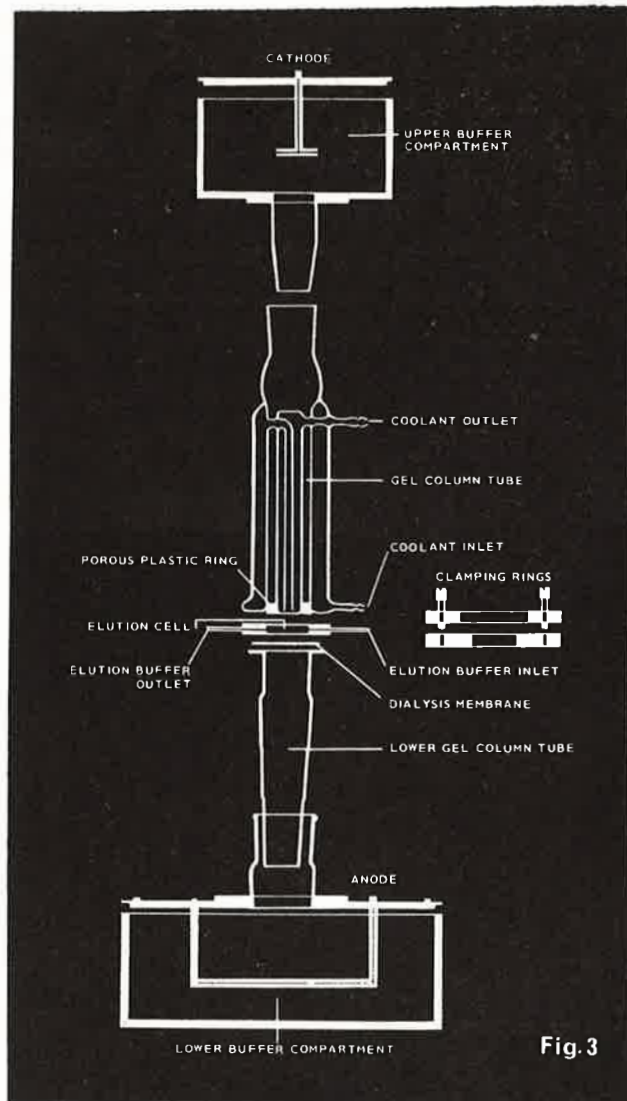
# KISTNER LAB

KORKEALUOKKAISIA LABORATORIOKOJEITA RUTIINIKÄYTTÖÖN — TIETEELLISEEN TYÖHÖN

Oy KISTNER Ab, Pääskylänrinne 8, Helsinki 50, Puh. 70 830

# SHANDON

## PREPARATIIVINEN AKRYLAMIDIGEELI-ELEKTROFOREESI



KAUKOMARKKINAT OY

Laboratorio-osasto

Fabianinkatu 9 Helsinki 13 Puh. 13 215

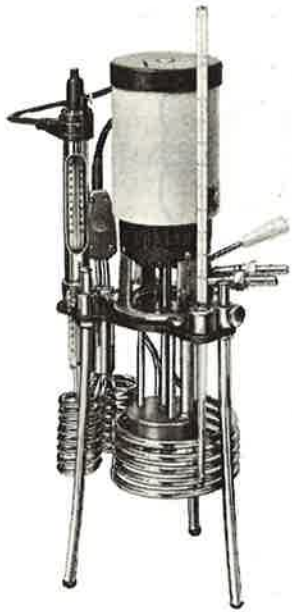
# DIFCO

*kaikki mikrobiologiset reagenssit ja elatusaineet*

bakterologien  
biokemistien  
biologien  
patologien  
ja farmakologien  
käyttöön  
heti hyvin varustetusta  
varastostamme  
tai  
n. kuukauden toimitusajalla  
tehtaalta  
DIFCO:n yli 70 vuoden  
kokemus takaa tuotteiden  
laadun  
stabiilisuuden  
taloudellisuuden  
tiedustelkaa teknillisiä  
tiedotuksia Difco-tuotteista

*elatusaineita  
mikrobiologisia tutkimusaineita  
kudosviljelyaineita  
serologisia reagensseja  
antiserumeja  
diagnostisia reagensseja  
herkkyyskikkoja  
peptoneja  
hydrolysaatteja  
aminohappoja  
entsyymejä  
värejä  
indikaattoreita  
hiilihydraatteja  
biokemikaaleja*

**H** HAVULINNA Oy  
Myynti ja näyttely  
Helsinki 10 Vuorik. 16  
puh. 61451 telex 12-426



# LAUDA

## ULTRA-termostaatit uusittu mallisto 1967

### LÄMPÖTERMOSTAATIT

- käyttöalue -60/ +300°C
- säiliö ruostumatonta terästä
- täysin transistoroitu, erillinen säätöyksikkö
- portaaton kuumennustehon säätö tyristoryillä
- alkukuumennus-automatiikka
- moderni, miellyttävä ulkonäkö

ONKO TEILLÄ PULMIA kylmätermostoinnissa?  
Messgeräte-Werk LAUDA on asiantuntija silläkin alalla:

### ULTRA - KRYOMAATIT

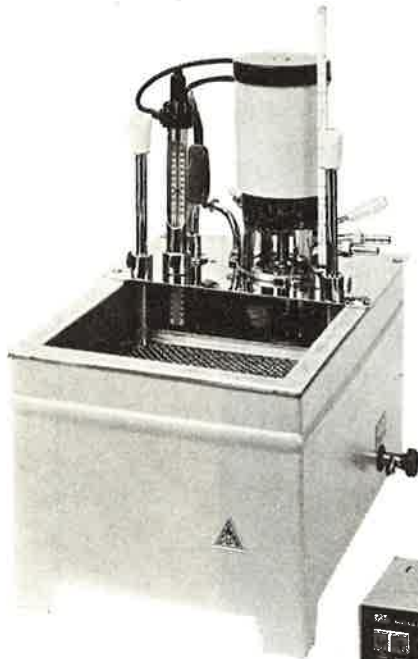
- käyttöalue +10/-120°C

### ULTRA - KRYOSTAATIT

- käyttöalue +40/-80°C

### LÄPIVIRTAUSJÄÄHDYTTIMIÄ

LAUDA - termostaatteihin liitettäväksi

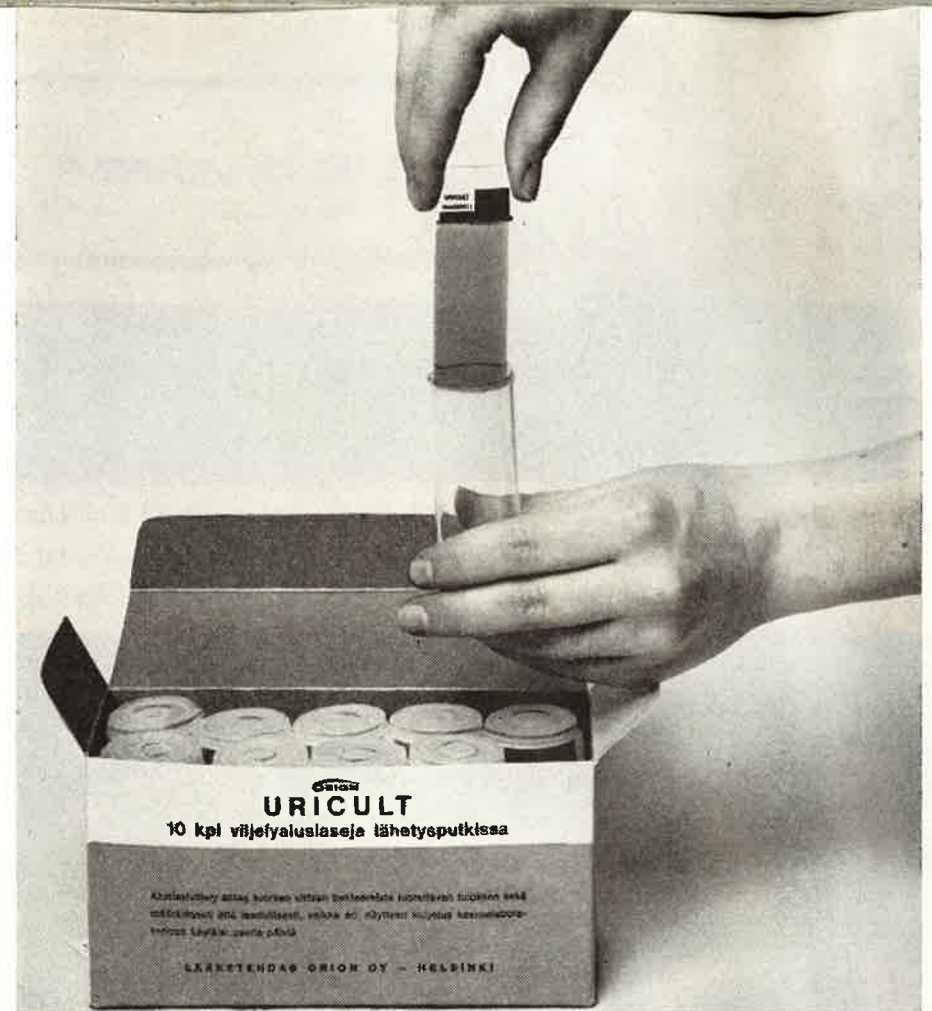


Messgeräte-Werk LAUDA  
Dr. R. WOBSEK KG  
Länsi-Saksa

Pääedustaja:

**KAUKO LEHTINEN**

Hki 18, Hietalahdenk. 7 A, puh. 643 852



# URICULT

*Virtsaviljelyä varten*

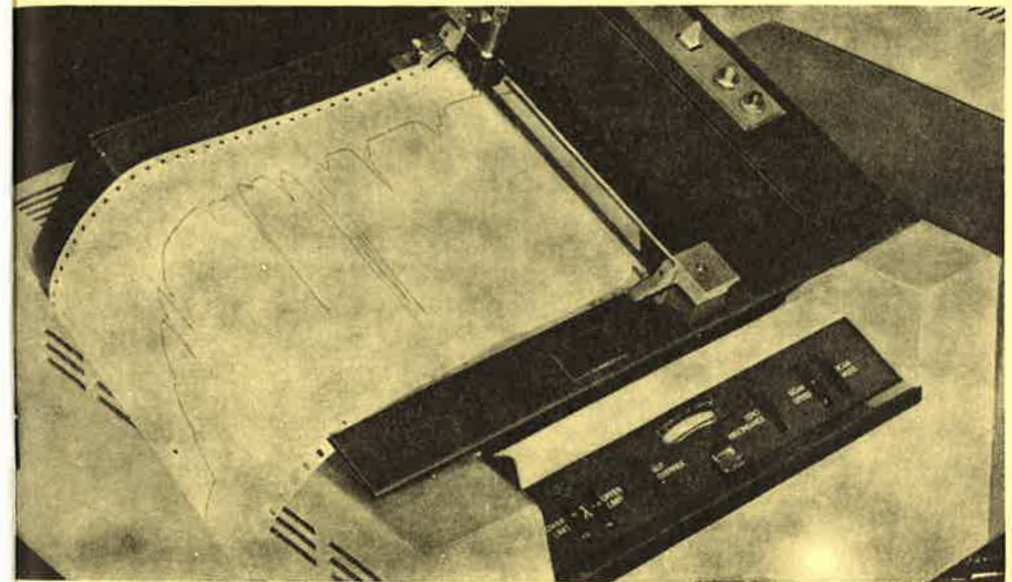
Vastalasketun virtsan bakteeripitoisuuden määrittäminen helpottaa virtsatieinfektioiden diagnoosia, koska sen avulla infektiota aiheuttava bakteerikasvu voidaan erottaa näytteenoton aikana tapahtuneesta kontaminaation aiheuttamasta bakteerikasvusta. Bakteerien lukumäärää arvosteltaessa voidaan nyrkkisääntönä pitää, että alle 10.000 bakteeria/ml merkitsee tavallisesti kontaminaatiota, 10.000-100.000 bakteeria/ml on epäiltävä alue ja yli 100.000 bakteeria/ml merkitsee tavallisesti infektiota. Bakteeriuria-joukkotutkimuksia on tähän asti ollut mahdotonta suorittaa, koska ei ole ollut käytettävissä yksinkertaista ja luotettavaa menetelmää. Uricult poistaa tämän puutteen. Uricult antaa tavallista pesälaskentatekniikkaa käyttäen vastalasketun virtsan bakteereista sekä laadultaan että määrältään luotettavan tuloksen, vaikka ao. näytteen kuljetus keskuslaboratorioon kestäisi useita päiviä. Aluslasin toisella puolella on elatusaineena ravintoagar ja toisella puolella Mac Conkey'n agar.

**ORION**

## PERKIN-ELMER



läitä säätimiä käyttäen voit ajaa automaattisesti mikä tahansa aallonpituusalueen 190–850 nm välillä uudella Perkin-Elmer spektrofotometrillä, malli 402.



Perkin-Elmerin uudessa UV- ja näkyvän alueen spektrofotometrissä, malli 402 on mutlaatuinen aallonpituuden säätö. Asettamalla aallonpituusalueen ylä- ja alarajoitteen voidaan ajaa mikä tahansa haluttu aallonpituusalue kerran tai toistuvasti, jolloin säätöistä riippuen spektrit saadaan peräkkäisille papereille tai haluttaessa päällekkäin samalle paperille.

Koko spektri 190–850 nm voidaan ajaa 2, 10 tai 40 minuutissa. Lineaarinen absorbanssiaseteikko voidaan levittää 5-kertaiseksi siten, että 0,3 absorbanssisyksikköä täyttää koko paperin. Halutulla aallonpituusvälillä voidaan suorittaa kineettisiä mittauksia. Yhdelle paperirullalle voidaan ajaa 40 täyttä spektriä ja rullan vaihto käy 30 sekunnissa.

Laajassa lisälaittevalikoimassa on mm. entsyymiläiläite, johon samanaikaisesti mahtuu 4 näyte- ja 4 vertailukyvetä. Laitteessa on 60° monokromaattoriprisma ja yksinkertainen vaimennusjärjestelmä. Koko optiikka on päällystetty magnesiumfluorilla syöpymisen estämiseksi.

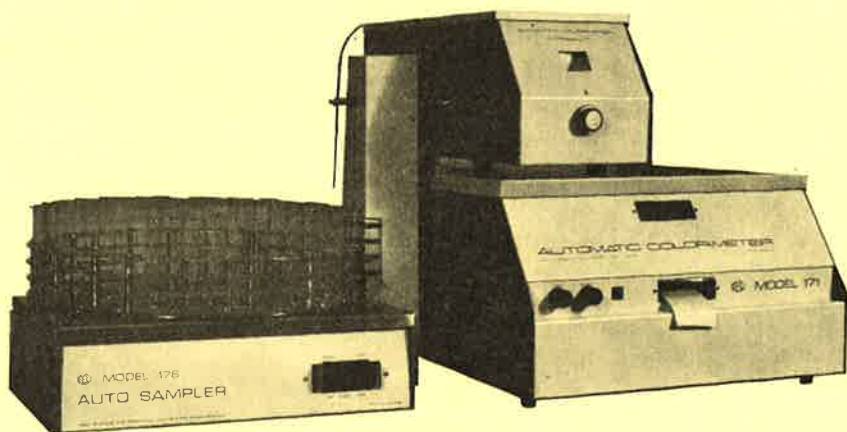
**Hinta 31 920:—**

Under Medicinska forskardagarna 29–30. 3. 68

såg Ni säkert denna



**NYHET**



## **AUTOMATISKT FOTOMETRISKT ANALYSSYSTEM**

Några data:

Automatisk nolljustering

Automatisk standardisering

Manuell användning möjlig även mitt i en  
mätningsserie

Med "tänkande" printer

Tiden för en mätning 18 sek.

Korrosionsskyddad pump för proverna

**G.W.BERG & CO**