

A fibrinogén és labilis fibrinogén immunelektrophoresises vizsgálata

Írta: **Fiam Béla dr.** orvosalezredes,
az orvostudományok kandidátusa
Jákó János dr.

A fibrinogen kimutatása (1—2), mennyiségének, ill. hiányának meghatározása (3), antigenitásának, fajspecifitásának tisztázása (4—12) „specifikus” fibrinogénellenes antisavóval számos közlemény tárgyát képezi.

Seligman (13) és Salmon (14) a fibrinogen és a fibrin immunkémiai vizsgálatánál, fibrinogenolízis és fibrinolízis degradációs termékeinek vizsgálata alapján 3 antigendeterminanst tételeznek fel. Salmon lehetségesnek tartja azt is, hogy az antisavók az egyes determinánsok ellen külön-külön antitesteket is tartalmaznak. Szerintünk az eltérés nemcsak az antigenitás különbözőségén — a három determináns csoporton ill. az ebből következtethető antitest többféleségen — alapulhat, változást okozhat a degradációs termékek partigen rokonságának fennmaradása mellett pl. az eltérő diffúziós koeficiens és elektrophoretikus mobilitás is. Mi a fibrinogen elektrophoresises mobilitását nem találtuk egységesnek és — mint a későbbiekben kiderült — ez a jelenség az ún. „labilis fibrinogen” jelenlétére volt visszavezethető.

A labilis fibrinogen (fibrinogen B, profibrin, monomerfibrin) normális viszonyok között nincs a keringésben. Megjelenik keringési zavarok, shock, sugárártalom (15—18) stb. kifejlődésekor. Fiam (15) vizsgálatai szerint ismételt vérvétel is kivált kisfokú, átmeneti, „labilis fibrinogen” megjelenést, illetve, ami még fontosabb — hiszen a közvetlen kémiai mediátor lehet — hisztamin (18) adása törvényszerűen „labilis fibrinogenaemiával” jár, s az előbb felsorolt esetekben a „labilis fibrinogen” megjelenését antihisztaminokkal ki is lehetett védeni.

Hozzá tartozik a „labilis fibrinogen” problematikájához az is, hogy a laboratóriumi vagy gyári körülmények között előállított fibrinogen állás közben spontán is alvad. A spontán alvadásban nagy szerepe van annak a ténynek, hogy a gyári fibrinogen béta-naphthol pozitív, tehát „labilis fibrinogen” tartalmú. Ezek alapján felvetődik az a kérdés, hogy az in vivo vagy in vitro körülmények között kialakuló „labilis fibrinogen” immunokémiaiilag azonosan viselkedik-e, illetőleg megjelenése és szerepe az „alvadási” rendszerben hogyan értékelhető?

Anyag és módszerek

1. Gyárilag előállított holland és az OVSZ által készített 1627-es számú fibrinogennel 4—4 nyulat (súlyuk 3000 gr-on felül volt) immunizáltunk, úgy hogy az oltásokat három naponként ismételtük 5 alkalommal intravénásan, az utolsó oltást komplett Freund adjuvánssal intramuscularisan adtuk (19), majd 8 nappal az utolsó — tehát 6. injectio után — az állatokat elvéreztettük. Nyulanként összesen 0,12 g fibrinogent injiciáltunk.

A Freund adjuvans összetétele (19): 8,5 ml Bayol F parafinolaj, 1,5 ml Arlcel A (mannit monooleát) és 20 mg előlt TBC-baktérium port tartalmaz 10 ml-ben.

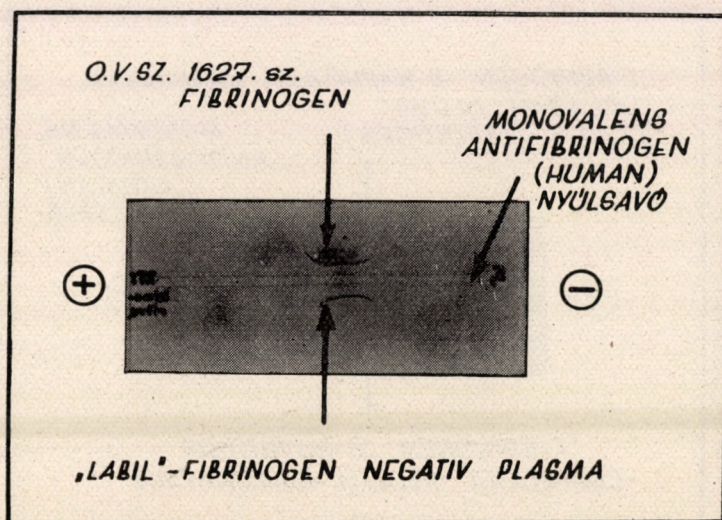
2. Az immunizálásra használt fibrinogen készítményeket immunoelektrophoresissel vizsgálva, megállapíthattuk, hogy mindkettő számos savóeredetű „szennyező” fehérjét tartalmaz, amely ismerve az előállítási procedúrát, természetes is. Ezért a kapott immunsavót 4:1 arányban elegyítettük kevert human-savóval, így monovalens antisavót kaptunk. Ez az antisavó igen magas titerben (1:8000 felett) tartalmaz fibrinogen ellenes ellenanyagot.

3. A fibrinogen immunoelektrophoresises analízisekor Scheidegger eljárását követtük (20). Vizsgáltuk „labilis fibrinogen”—fibrinogen immunoelektroforezisést, mind alvadásmegindítással arteficiálisan pozitívvá tett, mind beteganyagon talált béta-naphtol pozitívitas összehasonlításában. Az alvadás megindítását híg thrombin és CaCl_2 -oldattal végeztük. Arteficiálisan pozitív savót kaptunk histamin-oxalát alvadásgátló használatakor is. A béta-naphtol csapadékot 10—30% ureában oldva használtuk fel immunoelektrophoresisre.

Eredmények megbeszélése

A fibrinogen immunoelektrophoresisben jellegzetes praecipitációs ívet ad:

Katódálisan vándorol és a praecipitációs ív kettős íveltsége bizonyos antigen rokonságú, az ív alakjából következtethetően két eltérő motilitású fehérjére utal. Az immunsavó fajspecifikus, más állat (marha, kutya, tengerimalac, pat-



1. sz. ábra

kány, egér) plazmájával praecipitációs ívet nem ad, némi diffus „semipraecipitáció” immunoelektrophoresis analízissel azért kimutatható. Ez az eredményünk megegyezik Kesztyűs és mtsainak (10), ill. Szilágyi és mtsainak (11), valamint Bagdy és mtsainak (12) a fibrinogen fajspecifitására adott korábbi megállapításaival.

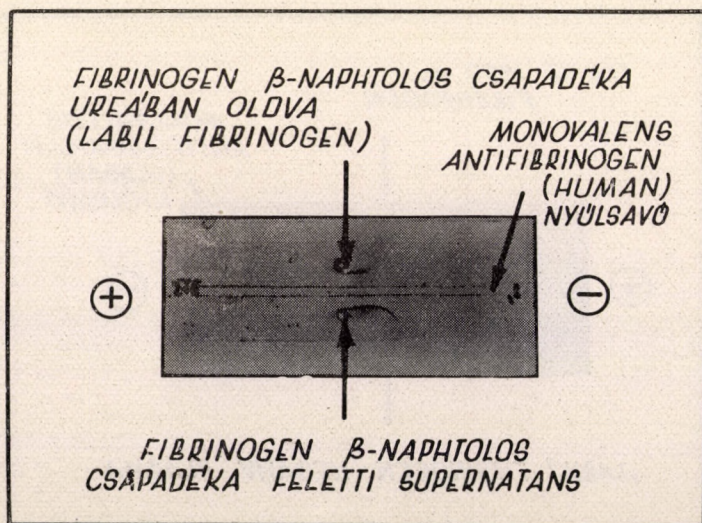
Ismert tény, hogy a béta-naphtollal (21—22) praecipitátumot adó plazmát „labilis fibrinogen” tartalmúnak mondjuk. A liofilezéssel tartósított normál fibrinogen béta-naphtollal ugyancsak pozitív reakciót ad, tehát modell anyagként felhasználható.

Holland liofil fibrinogen béta-naphtollal kezeltük és a szupernatant, ill. az ureában oldott csapadékot összehasonlítva immunoelektrophorezissel csaknem azonos erősséget kaptunk, tehát a béta-naphtol a fibrinogennek kb. felét csapja ki, a másik fele oldatban marad.

Hasonló mennyiségi viszonyokat kapunk a plazmában Ca^{++} -mal megindított alvadás során is, ha a plazmát thrombinnal olvasztjuk és béta-naphtolt adunk hozzá, akkor a szupernatans alig tartalmaz fibrinogent, a legtöbb a csapadékban marad és ureában nem oldódik.

Megvizsgáltunk 10 különböző egyénből származó olyan oxalátos plazmát, amely előzetes vizsgálatnak++++csapadékot adott, hogy egyformán viselkedik a béta-naphtollal kicsapható „labilis fibrinogen”. Az azonosság megállapítása után a későbbiekben 1 ml béta-naphtol pozitív human oxalát plazmához 0,1 ml híg 4 min.-ra olvasztó thrombinoldatot, majd 3 perc múlva 5 csepp béta-naphtolt adtunk a rendszerhez. A csapadékot lecentrifugáltuk, a szedimentumot ureában oldottuk, és a szupernatánssal együtt immunoelektrophoresissel analizáltuk. Antisavóként antifibrinogen nyúlsavót és human 249-es sz. antihuman lósavót használtunk. A szedimentum ureában oldott része a felcseppentési ponttól kissé katódálisan vándorolt, a lyukat körülöleli, míg a szupernatánsban levő fibrinogen a labilis fibrinogen „negatív” plazma praecipitációs ívét utánozza.

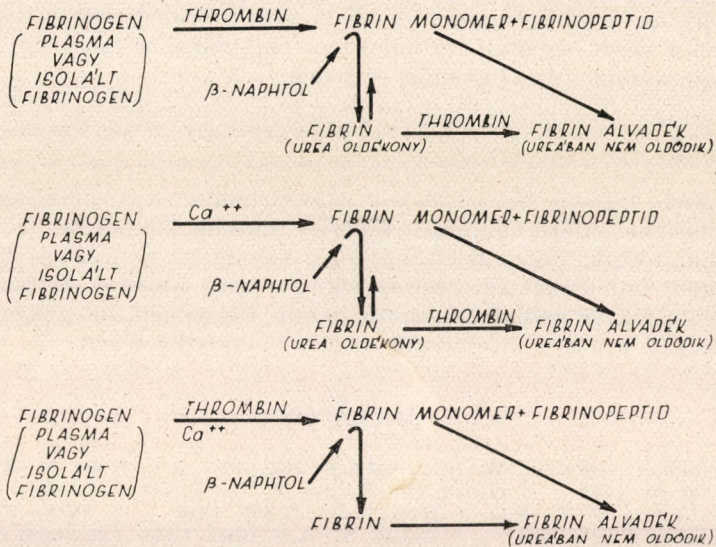
Amint várható volt, a 249-es sz. lósavóval specifikus ívet nem kaptunk, a szedimentumban csak a transzferrin és némi albumin praecipitált, a szupernatáns az egész alaprajzolatot adta.



2. sz. ábra

Thrombin helyett CaCl_2 -vel germinált, és béta-naphtollal kezelt plazmák ureában oldott csapadéka itt is, hasonlóan a normál plazmához és fibrinogenhez — kevesebb fibrinogent tartalmaz, a szupernatáns többet.

A vizsgálatainkban tehát a fibrinogentre jellemző olyan precipitációs ívet kaptunk, amely a fibrinogen heterogenitására utal. Emellett szól az a tény is, hogy a béta-naphtollal kicsapható és ureában oldott fibrin, mind motilitási, mind pedig ív szerinti alakeltérést mutat, míg a ki nem csapható fibrin a már említett specifikus ívalakot adja. Abban az esetben, ha az urea fehérjekárosító hatása kizárható, akkor a béta-naphtol által kicsapott és más praecipitációs jelleget adó labilis fibrinogen egyik komponensét képezi a nem homogén fibrinogen-fibrin fehérje csoportnak.



3. sz. ábra

Ennek a vizsgálatára a következő kísérletet végeztük: a gyári és plazmatikus fibrinogent thrombinnal, kalciummal ill. thrombin és calcium együttes adásával labilis fibrinogen képzésén keresztül alvasztottuk. A csak thrombin, vagy csak calcium hatása útján létrejövő monomer fibrinogen béta-naphtol pozitív csapadéka ureában oldódik, az urea oldat thrombinnal tovább alvasztható, de ureában már nem oldódik. Ez a tény az urea fehérje struktúra károsító hatása ellen szól. A thrombin és calcium együttes alkalmazásával kapott béta-naphtol csapadék azonnal urea oldhatatlan lesz, vagyis a kicsapódott béta-naphtol pozitív labilis fibrinogen itt már nem monomer, hanem irreverzibilis polimer alakban van jelen (3. sz. ábra).

Az eredmények megbeszélése

Kísérleteink során kapott adatok arra engednek következtetni, hogy 1. a labilis fibrinogen nem előfázisa a fibrinogen—fibrin átalakulásának, 2. funkció szempontjából a fibrinogen—fibrin között áll, 3. hisztamin hatására is létrejön, úgy, hogy valószínűleg a hisztamin a stabilizáló faktorról (23—24) való kapcsó-

lódást megakadályozza, vagyis a labilis fibrinogen stabilizáló faktor nélküli fibrinogen. E feltételezést természetesen még további kísérleteknek kell igazolni.

Az a megfigyelés, hogy a gyárilag előállított liofil fibrinogen oldat állás közben spontán alvad, béta-naphthol pozitív és az első alvadék ureában oldódik — tehát valószínűleg „labilis fibrinogen” — azt látszik igazolni, hogy ez a fibrinogen fajta gyorsabban alvad, tehát in vivo megjelenése kétségkívül thrombotikus irányú eltolódást jelent.

Meghatározása során külön figyelmet érdemel a valódi pozitivitás elkülönítése a vizsgálatok céljára levett plazma spontán alvadásától, mivel az anti-koagulánsal történt vérvétel számtalan hibaforrást rejt magában, így a „labilis fibrinogen” irányában történő vizsgálat különös gonddal végezendő.

Kísérleti eredményeinkből levonható gyakorlati konklúzióként megállapíthatjuk, hogy valószínűleg minden olyan in vivo folyamat, amely hisztamin felszabaduláshoz vezet, egyúttal thrombotikus hajlammal is jár, tehát a betegágy mellett ilyen szempontból figyelmet érdemel.

Összefoglalás

Nyulakban termelt immunsavóval végzett immunoelektroforezissel a human fibrinogenben két eltérő motilitású fehérjét tudtunk kimutatni.

Megállapítottuk, hogy a béta-naphthollal kicsapható és ureában oldódó „labilis fibrinogen” immunoelektroforezissel elkülöníthető. Átmeneti forma, valószínűleg stabilizáló faktor nélküli fibrin. A „labilis fibrinogen” megjelenése alvadás megindulásának a jele és thrombotikus irányú eltolódást jelent.

IRODALOM

1. Hektoen, L.—Welker, W. H.: JAMA 80:386, 1923. — 2. Kyes, P.—Porter, R. T.: J. Immun. 20: 85, 1931. — 3. Gitlin, D.—Borges, W. H.: Blood. 8:67, 1953. — 4. Pinniger, J. L.—Prunty, F. T.: Brit. J. Exp. Path. 27:200, 1946. — 5. Saeki, S.: Arb. med. Univ. Okayama 2, 610, 1931. — 6. Saeki, S.: Arb. med. Univ. Okayama 3, 1. 1932. — 7. Demanez, M. L.: C. r. Soc. Biol. 109, 553, 1932. — 8. Astrup, T.—Darling, S.: Acta Phys. Scand. 4, 45, 1942. — 9. Komatu, K.: Tohoku J. exp. Med. 29, 263, 1936. — 10. Kesztyűs L.—Szilágyi T.—Nikodémusz I.—Jávor T.: Kísérletes Orvostudomány, 4:1, 1950. — 11. Szilágyi T.—Bagdy D.—Jávor T.: Kísérletes Orvostudomány, 4:1, 1952. — 12. Bagdy D.—Szilágyi T.: Kísérletes Orvostudomány 4:1, 1953. — 13. Seligmann, M.: Rev. Franc. Études Clin. et Biol., 3:1073, 1958. — 14. Salmon, J.: Rev. Franc. Études Clin. et Biol., 4:51, 1959. — 15. Fiam B.—Resofszi P.: Honvédervos: 115, 1957. — 16. Fiam B.: Honvédervos, 12:148, 1960. — 17. Fiam B.: Honvédervos, 14:138, 1962. — 18. Fiam B.: Haematologia Hungarica 1:167, 1961. — 19. Heymann, W.—Hackel, D. B.—Harwood, S.—Wilson, S. G. F.—Hunter, J. L. P.: Proc. Soc. exp. Biol. and Med. 100:660, 1959. — 20. Scheidegger, J. J.: Internat. Arch. Allergy and Appt.-Imun., 7:103, 1955. — 21. Lyons, R. N.: Nature 155: 623, 1945. — 22. Lyons, R. N.: Austral. J. exp. Biol. 23:131, 1945. — 23. Lorand, L.: Physiol. Reviews, 30:742, 1954. — 24. Lorand, L.: Progress in Coagulation Schanter edit. Stuttgart, 1962, 238—254. old.

Д-р Фам Б., подполковник мед. службы, кандидат мед. наук, д-р Яко Я.:

ИММУНОЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ФИБРИНОГЕНА И ЛАБИЛЬНОГО ФИБРИНОГЕНА

В ходе иммуноэлектрофореза с помощью иммунной сыворотки полученной от кроликов удалось выявить в человеческом фибриногене два белка отличающихся по motильности.

Установили, что «лабильный фибриноген» который осаждается с помощью бета-наф-

тола и растворяется в мочеvine с помощью иммуноэлектрофореза отделяется. Является переходной формой по-видимому без стабилизирующего фактора. Появление «лабильного фибриногена» является признаком начала свертывания и означает сдвиг в сторону тромба.

Dr. B. Fiam, Oberstl. d. Med. D., Kandidat d. Med. Wissensch., Dr. J. Jákó:

IMMUNOELEKTROPHORETISCHE UNTERSUCHUNG DES FIBRINOGENS UND DES LABILEN FIBRINOGENS

Mit Hilfe der in Kaninchen erzeugten Immunsereen gegen das humane Fibrinogen führten Verfasser immunoelektrophoretische Versuche durch, somit gelang es ihnen im humanen Fibrinogen zwei Proteinen verschiedener Geschwindigkeit nachzuweisen. Fernerhin stellten sie fest, dass es mit dem Beta-Naphtol fällbare und in der Urea lösliche, sog. labiles Fibrinogen sich mittels Elektrophorese trennen lässt. Es handelt sich dabei um eine Übergangsform, wahrscheinlich um ein Fibrin ohne stabilisierenden Faktor. Das Erscheinen dieses labilen Fibrinogens gilt als Zeichen des Gerinnungsbeginns und weist auf eine Verschiebung in die Richtung der Thrombose hin.