

HEPARIN ÉS FEHÉRJÉK KÖLCSÖNHATÁSÁNAK VIZSGÁLATA

DOKTORI ÉRTEKEZÉS

A SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM TERMÉSZETTUDOMÁNYI KARÁHOZ

benyújtja

TÁRNOKI KLÁRA

SZEGED, 1961.



Diss. B 583



TARTALOMJEGYZÉK

Bevezetés.....	1 oldal
A heparin irodalmának áttekintése.....	4 oldal
Kísérleti eredmények és azok értelmezése.....	oldal
I. Heparin fehérjékhez való kötődése.....	22oldal
II. Heparin és protamin hatása a fibrinogén ki- csaphatóságára.....	48oldal
III. Heparin és protamin hatása a thymolturbidi- tási reakcióra.....	71oldal
Összefoglalás.....	84oldal
Irodalom.....	90oldal

Bevezetés

A heparin kémiai, biokémiai, valamint biológiai tulajdonságainak tanulmányozását elsősorban a szervezetben betöltött igen fontos szerepe tette szükségessé.

Sokoldalú kémiai reakciói közül az egyik legfontosabb és legrégebben vizsgált, de még ma sem teljesen megoldott problémája a heparin és a fehérjék között lejátszódó kémiai illetve fizikokémiai történések felderítése. Mint ismeretes a heparin számos hatását /pl. anticoaguláns hatását is/ a fehérjék egymásközötti reakcióinak komplex sorozatába való beavatkozása révén fejti ki. Számos szerző foglalkozott a serum, illetve a plazmafehérjék és a heparin között lejátszódó kémiai folyamatok mechanizmusának kutatásával. A kérdés megközelítését azonban rendkívül megnehezíti a fehérjék bonyolult szerkezeti tulajdonságai, valamint az a tény, hogy a fehérjék nem tekinthetők egységes, jól definiálható anyagnak. Aminosav összetételük alapján frakciókra bonthatók, s az egyes frakciók, mint azt különböző szerzők megállapították, a heparinhoz különböző affinitást mutatnak.

A jelen dolgozatomban a heparin - fehérje egymáshoz való reakcióinak vizsgálatával foglalkozom. Dolgozatomban első részében a fehérjéknek, mint egységes egészeknek a heparinhoz való kötődési viszonyait tanulmányozom, eltekintve attól, hogy a fehérjék aminosav összetételük alapján frakciókra bonthatók. A legújabb, izotop kénnel jelölt heparinnal végzett kísérletek alapján több szerző meg-

állapította, hogy a heparin a szervezetben fehérjékhez kötött állapotban fordul elő. Fehérjékhez in vitro hozzáadási kísérletben azt kívánom eldönteni, hogy melyek azon heparin mennyiségek, amelyek fehérjékhez kötött állapotban, illetve szabadon fordulnak elő. Ezen célból egy kémiai elven alapuló módszert dolgoztam ki a heparin meghatározására.

Mivel a fehérjék kémiai viselkedése szoros kapcsolatban áll a pH változásával, ezért a heparin-fehérje kölcsönhatások mértékét a pH függvényében is vizsgálom.

A heparin, mint azt több szerző megállapította, nagyfoku affinitást mutat a plazmában aránylag kis koncentrációban jelenlévő fibrinogén frakcióhoz. A fibrinogén-heparin kölcsönhatás vizsgálatával több szerző foglalkozott, mivel a fibrinogén a véralvadás folyamatában fontos szerepet tölt be. Ezzel szemben az irodalomban nem találunk közelebbi adatokat a heparinnak és a heparin antagonistájának, a protaminszulfátnak a fibrinogénre gyakorolt együttes hatásmódjáról. Ez utóbbi vizsgálata azért érdekes mind gyakorlati, mind elméleti szempontból, mert a heparin hatásának neutralizálása a gyakorlatban protaminszulfáttal történik.

Dolgozatom második részében a heparinnak és a heparin antagonistájának, a protaminszulfátnak külön-külön, valamint a fibrinogénre kifejtett együttes hatásának vizsgálatával foglalkozom.

A heparin a serumfehérje frakciók közül a globulinokhoz mutat legnagyobbaffinitást, míg az albuminnal

való reakciója csak kismértékű. Egyes szerzők megállapították, hogy a heparin megakadályozza a serumglobulinoknak desztillált vizes közegben létrejövő kicsapódását. Mivel a thymolturbiditási próba a serumban kórosan felszaporodott globulinoknak a thymololdattal való reakcióján alapul, ezért feltehető, hogy a heparin a globulinokra gyakorolt hatása révén a thymolturbiditás mértékét is megváltoztatja.

Dolgozatom utolsó részében a heparin, valamint a heparin antagonistájának, a protaminszulfátnak a thymolturbiditási reakcióra gyakorolt hatásával foglalkozom. Mivel a thymolturbiditási próba általánosan használt módszer a kórosan felszaporodott globulinok kimutatására, így a kérdés vizsgálata nemcsak elvi, hanem gyakorlati jelentőségű is.

Heparin irodalmának áttekintése

Már a századforduló előtt felismerték, hogy az emlősszék szöveteiben egy olyan anyag van jelen, amely befolyásolja a véralvadás mechanizmusát.

1916-ban McLean /1/ miközben trombokinaze hatású májphosphatidákat akart izolálni, egy olyan extraktumhoz jutott, mely éppen ellenkező hatású volt: késleltette a normális vér alvadását.

1924-ben Howell /2/ kimutatta, hogy a heparin nem sorolható a phosphatidák közé, phosphatot nem tartalmaz, hanem egy nitrogén tartalmu szénhidrát vegyület.

A heparin kémiai strukturájára vonatkozó vizsgálatokat elősegítette annak a ténynek felismerése, hogy a heparin bariumsóján keresztül tisztítható /Charles és Scott /3//.

Jorpes /4/ már 1924-ben kimutatta a heparin polysaccharida karakterét. 1935-ben arra az eredményre jutott, hogy az anyag uronsavat tartalmaz és kimutatta a hexozamin jelenlétét is. Az uronsavról kezdetben azt gondolták, hogy galacturonsav, így a chondroitinkénsavval lett volna közeli kapcsolatban. Wolfrom és Rice 1946-ban kimutatták, hogy ez glucuronsav /5/.

Jorpes azonban kimutatta, hogy a hexozamin kénsavval észterezett és az észter-szulfát tartalma 7-14% között változik.

Ekkor úgy gondolták, hogy a molekulában ismétlődő

egység egy disaccharida, amely glükózaminból és glucuronsavból áll. Keveset tudtak azonban az uronsav és az aminosukor kötődésének exact módjáról, valamint az észter-szulfát csoportok helyét sem ismerték.

Fürth, Hermann és Scholl /6/ feltételezték, hogy az összes természetben előforduló mucopolysaccharidák aminosukor csoportjai N-acetyláltak és ez a heparinra is áll. Sőt feltételezték azt is, hogy a mucitinnak polysulphursavas észtere.

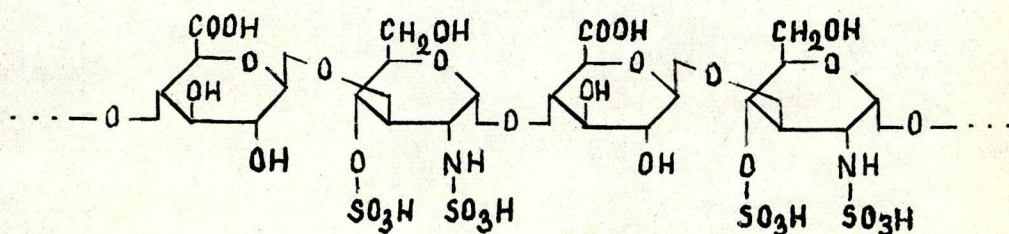
Wolfrom és McNeely /7/ megfigyelték, hogy ha heparint nagyon gyenge aciditásnak tesznek ki, elveszíti alvadésgátló hatását, amely arányos a szabad aminoscsoportok számával, tehát a biológiai aktivitás helye a nitrogénkötés lenne.

Jorpes, Boström és Mutt /8/ bebizonyították, hogy a glükózamin aminoscsoportjai szulfurálva és nem acetylálva vannak. A heparin ebből a szempontból különbözik a többi mucopolysaccharidától, amelyek aminoscsoportjaikon többnyire acetylezve vannak.

Wolfrom, Montgomery, Karalinos és Rathgeb /9/ natriumheparinátion és lebontási termékein végzett perjodát oxidációs kísérletek segítségével tisztázták a heparin strukturáját, amelyet később más vizsgálatokkal is alátámasztottak, mint 2,4-dinitrofluoro-benzol /aminoblokkoló reagens/ használatával és toluol-p-sulphonat /tosylat/ technikával.

A heparin ezek szerint glükozamin és glükuronsav molekulákból épül fel, amelyek α -glükozid kötással kapcsolódnak. A benne található kénsav részben a glükozamin aminos-csoportjához, részben pedig 4. hidroxyl csoportjához kapcsolódik.

A heparin szerkezetét mutatja az alábbi részlet képlet.



A fentebb említett /2,4-dinitrofluoro-benzol és tosylation/ módszerekkel meg lehet állapítani különböző forrásokból eredő tökéletesen megtisztított készítmények struktúráját. Ezekből az eredményekből az adódik, hogy a heparin - tágabb értelemben véve - nem tekinthető egységes, jól definiált kémiai vegyületnek.

Jaques és Waters /10/ kimutatták, hogy különböző állatok májából kivont heparin nem volt azonos aktivitású, jóllehet a kémiai analysis nagyon hasonló kémiai összetételt mutatott. Marbett és Winterstein /11/ hasonló eredményekről számol be.

Bell /12/ papírchromatografálási vizsgálatai alapján szintén megállapította, hogy a különböző állatokból nyert heparin különböző.

Molekuláris nagyság

A heparin molekulásúlya viszonylag alacsony, és a molekuláris nagyság homogenitása szempontjából változó.

A legtöbb számítás a molekulásúlyt $M = 16,000$ állapítja meg mint a vizsgált készítmények molekuláinak átlagát. Ultracentrifugálás segítségével két, három vagy több változó molekuláris nagyságu és aktivitásu frakciót lehetett elkülöníteni /Grönwall, Ingelman és Mosiman /13//. Ultracentrifugálás útján Neely /14/ két frakciót identifikált. Az egyiknek aránylag alacsony az alvadéagtóló hatása és a $M = 16,000$; a másiknak magas az aktivitása és a $M = 50,000$.

Általában 16,000-es molsúlyu heparin preparátumokat hoznak forgalomba, amelyek 13 cukoregységet tartalmazó polimerből állnak. Kevés adatunk van ezeknek az egységeknek az elhelyezkedésére vonatkozóan: nem ismeretes, hogy ezek elágazó vagy egyenes láncokban helyezkednek-e el.

Grönwall és munkatársai /13/ a heparin ultracentrifugálásával és diffúziójával végzett vizsgálatai arra utalnak, hogy a molekula erősen aszimmetrikus,

Lehetséges, hogy a heparin látszólagos heterogenitása az izolálással kapcsolatos manipulációktól származik. Bottle, és munkatársai /1953/ /15/ mutatták ki, hogy alkálikus közegben, oxigén jelenlétében a polysaccharida-láncok széthasadnak. Ismeretes az a tény, hogy

az oxigén szulfátcsoportok alkálival szemben relative labilisak. Így könnyen lehetséges, hogy a szokásos izolálási és tisztítási műveletek végterméke lényegesen különbözik a molekulának attól a formájától, mely a szövetekben előfordul.

Fizikai jellemzők

A heparin rendszerint erősen jobbra forgató, mely arra utal, hogy az azt felépítő saccharidaegységek alpha-glükózid kötéseket tartalmaznak.

Az irodalom számos adatot szolgáltat a heparin specifikus optikai forgatóképességre, amelyek elég nagy ingadozást mutatnak, mivel egységes heparinról nem beszélhetünk. A legtisztább fokú marha-heparin natrium sójáról azt állapították meg, hogy a spec. optikai forgatóképessége $[\alpha]_D^{20} = +65^\circ$, S tartalma: 13,8 %, alvadásgátló hatása 130 IE/mg. /Jorpes /16//.

Más kereskedelmi készítmények kevesebb S tartalommal és kisebb alvadásgátló hatással alacsonyabb optikai aktivitást mutatnak /Walton and Ricketts /17//. Egyes szerzők a heparin specifikus optikai forgatóképességre lényegesen kisebb értéket adnak meg.

Ave és Stüdemann /18/ középértékként $[\alpha]_D^{20} = 46,5^\circ$ mutattak ki.

A szulfurált heparinok ennél lényegesen kisebb értékekkel rendelkeznek: $[\alpha]_D^{20} = 13,1^\circ$

Nem látszik reálisnak Marbet and Winterstein /11/ által javasolt terminologia elfogadása, amely sze-

rint a szerzők megkülönböztetnek α -heparint, mely jobbra forgató és magas anticoaguláns hatással bír, valamint β -heparint, amely ugyanazon forrásból ered, balra forgató és alacsonyabb az alvadásgátló hatása. A szerzők ugyanis a β -heparint nem tudják megkülönböztetni a chondroitin-kénsavtól, csupán az anticoaguláns hatás tekintetében.

A heparin ultraibolyában történő spectralanalízise /Awe and Stüdemann /18// nem ad megfelelő jellemzőket a heparin vizsgálatára. Minden heparinkészítmény többé-kevésbé észlelhető inflexiós pontot mutat 230-250 $m\mu$ hullámhossz tartományban. Ez a hullámhosszterület mind a heparinoidokra /nyers és szulfurált heparinoidokra/, mind a polysaccharidokra általános. A nyers heparinkészítmények 250 $m\mu$ alatt erősebben abszorbeálódnak, míg a tiszta heparin abszorpció maximummal nem, vagy alig rendelkezik.

Az esterszulfátok jelenléte erős elektronegativ töltést ad a heparinnak. Ezt mutatja a heparin magas elektromos vezetőképessége és az elektromos mezőben való nagyfokú kataphoretikus mobilitása /Wilander /19//.

Bár ezen jellemzők arra utalnak, hogy a reaktív csoportok erősen disszociálnak, a heparin oldatok osmotikus nyomása mégis rendkívül alacsony citrát vagy oxalát oldatokkal szemben, és így a heparin nem gyakorol osmotikus befolyást a vörösvértestekre.

Összefüggés a heparin alvadásgátló hatása és kémiai szerkezete között

Definíció szerint a nemzetközi standard heparin

anticoagulans hatása 130 IE/mg. A legtöbb brit, svéd és amerikai kereskedelmi készítmény aktivitása: 90 - 120 IE/mg.

Kísérleteket végeztek a kórisai szerkezet és az alvadásgátló hatás korrelációba való hozására. Ezekből az eredményekből adódik, hogy a heparin a fehérje-fehérje egymáshatások komplex sorozatába avatkozik be, azál tal, hogy a véralvadásban résztvevő fehérjével kapcsolódik. Ez a fehérjével való reaktivitás a heparin elektronegativ töltésének tulajdonítható, mely a heparin savi gyökeiktől származik /Demole and Reinert /20/, Bergström /21//.

A heparin molekula savi gyökei: az uronsav szabad carboxyl-gyökei, az O-szulfát és N-szulfát csoportok /amino-szulfát/. Physiologiás pH-nál a szulfát-csoportok csaknem teljes mértékben disszociálva vannak, ezzel szemben a carboxyl-csoportok relative csak kismértékben disszociálnak. Az egész molekula elektronegativ töltését tehát főleg csak a szulfátcsoportok okozzák.

Jorpes and Bergström /22/ nagy jelentőséget tulajdonítanak a heparin szulfátcsoportjainak a véralvadásgátlás mechanizmusában. Ez utóbbi akkor derült ki, amikor azt találták, hogy bármely biológiai forrásból eredő heparin anticoagulans hatása nagyjából parallel haladt annak S tartalmával. Más polysaccharidák, mint pl. a keményítő, cellulose, chitin stb. szulfurálásával heparin szerű anticoagulans hatást lehetett kiváltani. Több szerző erősítette meg ezt a tényt, azzal, hogy bebizonyították, más, ké-

mielleg nem hasonló összetételű polymerek szulfurálása /polyvinylalkohol/ hasonló hatást hozott létre.

Az anticoagulans hatásban a glucuronsav carboxyl-csoportjának nem sok szerepe van, mivel a carboxylált polysaccharidok szulfurálása azok aktivitását nem növeli /Karrer, Usteri and Camerino /23//.

A heparin magas anticoagulans aktivitását nem csupán az oxigénszulfát csoportok okozzák. Erre utal az a kísérleti eredmény, mely szerint az ilyen csoportokat tartalmazó szintetikus polysaccharida-szulfátok maximális aktivitása kisebb 30 IE/mg-nál. Ezek után feltételezték, hogy az anticoagulans hatás a N-szulfát csoportoknak köszönhető. A chitosane /a glucosaminnak természetesen előforduló polymerje/ szulfurálással, vagy pedig a chitin és a chondroitin-szulfát N-deacetylálásával, melyet szulfurálás követett, a szerzők nem jutottak egyértelmű eredményhez. Rickets /24/ nem talált aktivitás növekedést, a többi kutató viszont azt észlelte, hogy anyaguk aktivitása 48-57 IE/mg-ot is elért.

Doczi, Marlew and Stacey /26/ ezzel szemben azt tapasztalta, hogy azok a heparin készítmények, amelyek N-szulfát tartalma magas, alacsony aktivitást mutatnak.

Valószínűnek látszik, hogy egyes szerzők túl nagy figyelmet fordítottak a szulfaminocsoportokra és a heparinnak az analogonjainál nagyobb aktivitása sem a N-szulfát, sem az O-szulfát csoportoknak nem tulajdonítható,

hanem egy különleges molekuláris konfigurációnak, melyet ezen csoportok közötti belső kötések hoznak létre /Foster, Martlew and Stacey /26//.

Ezen tapasztalatok szerint a finom molekuláris szerkezetben való különbségek azok, amelyek variációt hoznak létre a molekula nagyságában és alakjában, és tehetők felelőssé azért a tényért, hogy az aktivitás és a S tartalom közötti parallelizmus eltűnik akkor, ha különböző fajokból származó heparint hasonlítunk össze.

A heparin kémiai reakciói

A heparin organikus bázisokkal mint a benzidin, octylamin, vegyületet alkot; alkaloidákkal /kinin, brucin/ és olyan anyagokkal is, melyekben bázikus aminosavak dominálnak: protaminok, histonok, bázisos polyaminosavak /pl. lysin/ és bázisos festékekkel. Élénk érdeklődés tárgyát képezi a heparinnak és a pharmacologiai jelentőségű anyagoknak egymásra hatása, mint a histamin, antihistaminok, histamin felszabadító anyagok /Riley /27//. A bázisos histamin sószerű vegyületet képez a savas heparinnal és a diffuzibilis histamin ezáltal rögzítődik a vörösejtekben /Werle and Amann /28//.

Ha a fent említett anyagoknak a szabad bázikus csoportja reagál a heparin molekula savanyu csoportjával, a heparin anticoagulans hatása megszűnik.

Ez képezi az alapját annak, hogy a klinikai gyakorlatban protamint vagy toluidinkéket használnak a heparin hatásának neutralizálására.

Metachromasiás reakció bázikus festékekkel

A heparin bázisos festékekkel chromotrop anyagként viselkedik. Ha toluidinkék ~~xxxoldat~~hoz növekvő koncentrációban heparint adunk, a festék színe normális /orthochromatikus/ kékből biboron keresztül vöröses ibolyára /metachromatikus/ változik. A heparin hatására ~~xxxxxx~~ metachromázia lép fel a bázikus oxazin, phenazin, thiazin csoporthoz tartozó szinanyagoknál. A reakció nem specifikus a heparinra, más polysaccharidakénsavak /természetesen előfordulók és szintetikusak/ is adják ezt a reakciót. Ezenkívül gyengébb intenzitással a polycarboxylatok, polyphosphatok is chromotropok a bázikus festékekkel.

A reakció alapjaira irányuló quantitativ vizsgálatok azt mutatták, hogy a metachromázia intenzitása egyenesen arányos a kapcsolódó savigyökök számával és diszociációs jellemzőivel, nem pedig a molekulát felépítő glükóz polymeregységek elhelyezkedésétől vagy számától függ; vagyis a metachromázia intenzitása gyakorlatilag egyenesen arányos a savanyu polysaccharidák S tartalmával és nem arányos azok polimerizációjának fokával /Walton and Ricketts /17//.

Bár a metachromasiás reakció eléggé érzékeny lehet annyira, hogy képes 2-5 mikrogram/ml koncentrációjú heparint is kimutatni, mégis a fehérjék és más anyagok jelenléte, amelyek képesek a festéket megkötni, zavarják a vizsgálat érzékenységét. Ennek ellenére ezt a reakciót

felhasználják a szövetekben lévő, feltehetően heparin kimutatására /Holmgren and Willander /29// és szövetnedvekben quantitative /Copley and Schnedorf /30/ Jaques, Monkhouse and Stewart /31/; Jaques /32/; Walton /33//.

Kimutatás

A heparin kimutatására számos módszert dolgoztak ki. A nagyszámú meghatározás arra enged következtetni, hogy egyik sem tökéletes a maga nemében. Jaques, Waters and Charles /34/ azt találták, hogy különböző fajokból származó heparinok különböző anticoagulans hatást mutattak, ha különböző módszerekkel vizsgálták.

A heparin meghatározható

a/ alvadás fiziológiai úton

b/ fiziko-kémiai reakció alapján

c/ az anticoagulans nyérése tiszta formában

a/ Általánosan elfogadott, hogy a heparin anticoagulans hatását olyan biológiai rendszerben mérjük, mely magában foglalja a normális véralvadási mechanizmust. Bár sok módszerben plazmát használnak a heparin kimutatása során, mégis azon szerzők, akiknek ezen a téren nagy tapasztalatuk van, a teljes vér használatát ajánlják. Jalling és munkatársai /35/ a heparin meghatározására u.n. teljesvér módszert dolgoztak ki.

Az anticoagulans aktivitás meghatározható a thrombin vagy prothrombin alvadási idejének meghosszabbodása alapján oxalát vagy citrát plazmából /Studer and Winterstein /36/; Pritchard /37/; Blombäck és munkatársai /38//.

b/ Fizikokémiai reakción alapulnak: 1/ a protaminnal való titrálás, amely azon az elven alapul, hogy a heparin a protaminnal egy stabil sószerű vegyületet képez és a heparin elveszti ezáltal anticoagulans hatását /Kaller /39/; Refu és Vestergaard /40//.

2/ Toudinkéssel való reakció /colorimetriás meghatározás/ /MacIntosh /41/; Awe and Stüdemann /42//.

c/ Az anticoagulans izolálása tiszta formában.

Egyes szerzők különböző módszereket dolgoztak ki, hogy a normál emberi vérben jelenlevő természetesen előforduló heparinszerű anticoagulans anyagot kinyerjék. Freeman és munkatársai /43/ a keringő heparin izolálására a heparint előzetesen n-octylaminnal kicsapták, majd ezt követően NaOH jelenlétében $ZnSO_4$ -al ismételten kicsapták. Az in vivo és in vitro visszanyerési kísérletek eredménye arra enged következtetni, hogy ezzel a módszerrel csak a fehérjéhez kötött heparint lehet meghatározni.

Ugyancsak a fehérjéhez kötött heparin nyerhető vissza Monkho use és Jaques /44/ módszerével. A meghatározás azon az elven alapul, hogy a phenol hatására a proteinek a plazmából kicsapódnak, a heparin a tiszta protein mentes szűrletben marad.

Nilson /45/ a vér anticoagulans tartalmának meghatározására oxalatos plazmából $Ca_3/PO_4/2$ adszorbenssel nyerte ki a heparint, citráttal való eluálás után alkohollal kicsapták, ezt követően proteolitikus "emésztéssel" és ismételt alkoholos kicsapással történő tisztítás után 1 l plazmából 1,5 g olyan anyagot nyertek,

amely anticoagulans aktivitással rendelkezett.

Biológiai viselkedés

A heparinnak sokféle biológiai hatása van. Kimutatták, hogy egyes enzimek működésére gátlólag hat. Így pl. a heparin gátolja aktivitásában a fumerozet, trypsin, hyaluronidaset, a streptococcus ribonucleaset, a cathepsint, a szöveti ribo- és desoxyribonucleaset. A heparin in vitro gátolja a plasmin aktivitását, viszont in vivo gyorsítja a thrombus feloldódásának mértékét.

Régóta ismeretes, hogy a heparin gátolja a mitozist. Baktériumok, emlős sejtek és szöveteknek az in vivo növekedését és differenciációját már alacsony heparin koncentrációk is gátolják, de arra nincs bizonyíték, hogy normális állat növekedésére bármi hatást fejtene ki.

Fehérjékre kifejtett hatása

A heparin, más, több anionnal bíró colloidhoz hasonlóan a fehérjékkel azok izoelektromos pontja alatt oldhatatlan sókat képez /Clarke and Monkhouse /46//. De azok a reakciók, amelyeket a heparin a biológiailag fontosabb fehérjékkel ad physiologias pH mellett jönnek létre, és látható csapadék képződés nincs.

Chargeff, Ziff and Moore /47/ a plazma fehérjék elektrophoretikus képében beálló változásokat vizsgálta heparin hozzáadására. Ezen szerzők a heparint igen magas, nem physiologias koncentrációban használták, eredményeik korlátolt érdekességűek.

Hoch and Chanutin /48/ sokkal alacsonyabb koncentrációkat használva azt tapasztalták, hogy olyan heparin mennyiségek, melyek nem elegendőek a véralvadás gátlására, nem befolyásolják az elektrophoretikus képet. Valamivel magasabb koncentrációk mellett a heparin oldható komplexet alkotott a β -globulinokkal és a fibrinogénnel is. Ezen komplexek mobilitása növekedett az anticoagulans anyag koncentrációjának mobilitásával. Az albuminnal és a γ -globulinnal való reakció aránylag csekély volt. A komplement aktivitás a különböző globulin komponensek együttes hatása. Kimutatták, hogy a heparin egyenesen ezen komponensek egyikére vagy többjére gyakorol hatást. Tehát nem a vörösvértestekre vagy a haemolizáló antigénre fejt ki hatását. A polysaccharida-szulfátok antikomplement hatása a vizsgálatok szerint a molekula nagyságától és töltésétől függ, az anticoagulans hatással nincs összefüggésben /nem közölt eredmények/.

A plazma lipoidok és lipoproteinekre kifejtett hatása

Hahn /1943/ /49/ észlelte először, hogy ha kutyáknak alimentáriás lipaemia időszakában heparint adott, ez utóbbi a plazma zavarosságának feltisztulását okozta. A heparin ezt a hatását nem közvetlenül a plazma lipoidjára fejt ki - mivel a heparin nem gyakorol lipaemiás plazmára hasonló hatást, ha in vitro adjuk hozzá - hanem egy globulin komponensen keresztül /lipaemia clearing faktor/.

Az anticoagulans hatás módja

A heparin, mivel a globulinokkal különféleleképen reagál, a vér-alvadás láncreakciójába több mint egy ponton avatkozik be.

Antithrombikus hatás

Eleinte azt hitták, hogy a heparin a természetes antithrombin. Ez a téves elképzelés hamarosan megdőlt, amikor kimutatták, hogy a heparin nem akadályozza meg a tisztított thrombin és fibrinogén egymásra hatását, ha plazma vagy szerum nincs jelen a rendszerben. Mai felfogás szerint a heparin co-faktor különbözik az antithrombintól /Volkert /50//.

Seegers, Warner, Brinkhous and Smith /51/ azt állította, hogy a heparin katalitikusan hat a co-faktora jelenlétében: növeli az inaktiválás sebességét, de nem az elbomlott thrombin mennyiségét.

Prothrombinra való hatás

H owell szerint a heparinnak az antithrombikus hatása mellett antiprothrombin hatása is van. Ezzel szemben Quick /52/ kimutatta, hogy a heparin jelenlétében a prothrombinnak thrombinná való átalakulása végbemegy.

Brinkhous, Smith, Warner and Seegers /53/ azt találta, hogy egy szerum co-faktor jelenlétében a prothrombin átalakulás gátolt, hasonlóan a thrombin-fibrinogen reakcióhoz. Nem tudták azonban megállapítani, hogy ez a heparin antithrombin vagy antithromboplastin hatásának tulajdonítható-e.

Thromboplastinra való hatás

Agyeredetű thromboplastinnak a heparinos plazmához való adása csökkentti annak alvadási idejét. Quick /52/ azon a véleményen van, hogy a heparin és a thromboplastin között nincs direkt egymásra hatás.

Chargaff, Ziff and Cohen /54/ azonban egy thromboplastikus hatású lipoproteint izolált a tüdőből és kimutatta, hogy az heparin hatására disszociál. A heparin kötődik a fehérje részhez, a lipoidot szabadít fel.

Overman a heparin fő hatását abban látja, hogy egy aktív anticoagulans hatású lipoid frakciót szabadít fel.

Azt tartják, hogy a thrombocyták és a plazma faktorok egymásra hatása, amikor a plazma idegen felülettel, pl. üveg, kerül érintkezésbe, aktiválja a plazma thromboplastint. Kimutatták, hogy a heparin anticoagulans hatása szilikonozott üvegnekükben nyert thrombocyta mentes plazmában fokozódik, ha azonban ezt a plazmát üveggel hozzuk érintkezésbe /nem szilikonozott/, akkor olyan mértékben csökken a heparin anticoagulans aktivitása, mint az üveg felülete, mellyel érintkezésbe hoztuk.

A heparin anyagcseréje és kiválasztása

Az utóbbi időben Burke /55/ és Riley /56/ ismertette bővebben a heparinnak a húzósejtekből való származását. Még nincs eldöntve, hogy a heparin egyáltalán jelen van-e a keringő vérben, vagy egyáltalán felszabadul-e masszív ionizáló sugarak hatására, mint azt egy időben gondolták.

A heparin intravénás beadása után a vizeletben megjelenő anticoagulans úgy viselkedik, mint a heparin. A szervezetben való áthaladása közben azonban partialis inaktiválódást szenved, anélkül, hogy a hatóanyag kémiai természete lényegesen megváltozna. Jaques, Napke és Levy /57/ kísérleti eredményei szerint a beadott heparinnak 25-50 %-a nyerhető vissza a vizeletből, a kezdő dózis nagyságától függően.

Azt tartják, hogy a heparinnak az a részét, amely nem választódik ki a vizelettel, egy enzim bontja el, az u.n. heparinaze, melyet Jaques /58/ izolált a májból. Kezdetben azt tartották, hogy ez mint specifikus enzim lebontja a heparin molekulát anélkül, hogy a szulfát csoportokban veszteség állna be. De az újabb vizsgálatok/Jaques és Kéri Szántó /59// azt mutatták, hogy az antithrombikus aktivitás csökkenése együtt jár a metachromatikus aktivitás csökkenésével. Ez arra utal, hogy szulfát veszteség is van. Marbet és Winterstein /60/ kimutatták, hogy a heparinnak a szervezetben való áthaladása közben fellépő aktivitás csökkenése csak részben vezethető vissza a szulfocsoportok lehasadására. Viskozitás meghatározások alapján arra a következtetésre jutottak, hogy a heparin részben depolimerizálódik. Feltehető, hogy az alacsony molsúlyú részek a szervezetben való áthaladás közben semmilyen változást sem szenvednek, míg a magas molsúlyúak teljesen lebomlanak.

Heparinoidok

A heparinhoz hasonló vegyületek egyrészt természetes, másrészt szintetikus eredetűek. Nem emlős szövetekből izolált polysaccharida-szulfátok szintén heparin-szerű hatást mutatnak. Szintetikus heparin pótló anyagokat a keményítő, cellulóze /pentose, hexose/, polygalacturonsav, chitin stb. szulfurálása révén állítanak elő.

A heparinoidok hasonlóak a heparinhoz, amennyiben 1/ hasonló változásokat okoznak a plazmaproteinek elektrophoretikus képében; 2/ feltisztítják a lipaemiás plazmát /clearing faktor/; 3/ ugyanazon enzimrendszereket gátolják; komplement ellenes hatást fejtenek ki; 5/ hasonlóan reagálnak ugyanazon bázisokkal és bázikus festékekkel.

Ezen hatásuk intenzitása meghaladja a heparinét azonos súlyra számítva. Anticoagulans aktivitásuk azonban jóval kisebb mint a hepariné.

I. Heparin fehérjékhez való kötődése

Fischer már 1932-ben /61/ - amikor még a heparin kémiai szerkezetét és hatásainak sokféleségét nem ismerték - kimutatta, hogy a heparin erősen kötődik a fehérjékhez.

1935-ben közölt cikke /62/ részletesen foglalkozik a fehérjék és a heparin között létrejövő kémiai reakciók mechanizmusával. Ezek szerint a közöttük létrejövő kötési viszony a pH-tól függ. A heparin a fehérjékkel azok izoelektromospontjain, vagy az izoelektromospont alatti savastartományban sokat képez.

A szérumfehérjék egyes frakciói a heparinhoz különböző affinitást mutatnak.

Chargaff, Ziff és Moore /47/ elektrophorézises kísérletei alapján azt találta, hogy magas heparin koncentrációk esetén a reakció az albuminokkal nagymértékű volt, míg a globulinok alig kötődnek a heparinhoz.

Ezzel szemben Hoch és Chanutin /48/ kimutatták, hogy a heparin a plazmafehérjék α_2 és β globulin frakciójához kötődik.

Aman és Werle /63/ a véralvadásban résztvevő fehérjéknek, a thrombinnak valamint a fibrinogénnek a heparinhoz való kötődését vizsgálta: a heparin a thrombinhoz kapcsolódva megakadályozza a fibrinogén-fibrin átalakulást.

Eiber /64/ izotóp kénnel jelölt heparinnal végzett kísérletei alapján arra a megállapításra jutott, hogy

az intravénásan beadott heparin teljes mennyisége a vérszérum-illetve plazmafrakciójában van.

Felmerül az a kérdés, hogy physiológias körülmények között a heparin milyen formában van jelen: szabadon, a szérum illetve a plazmafehérjékhez kötődve, a vörösvértestekhez adszorbeálódva, vagy részben kötött, részben szabad állapotban.

A szérumfehérjék és a heparin között létrejövő reakció mértékét in vitro heparin hozzáadási kísérletekben vizsgáltam. A heparin meghatározására egy kémiai elven alapuló módszert dolgoztam ki az eddig általánosan ismert és használt módszerekkel szemben, melyek főleg biológiai illetve biokémiai eredetűek.

Módszer

A módszer azon a kémiai elven alapul, hogy a heparin mint polysaccharida típusu anyag tömény sósavval való hidrolízis folyamán glukoz egységekre /glukozamin és glucuronsav/ bomlik. A sósavas hidrolízis után a diphenylaminnal képzett színreakció alapján kimutatható. A glukoz is adja ezt a színreakciót, ezért a meghatározás előtt élesztőzéssel el kell bontani.

Reagensok

- 1/ 10 %-os $ZnSO_4$ oldat
- 2/ 2 %-os NaOH oldat
- 3/ 5 %-os trichloreccetsav

4/ Diphenylamin-reagens: 6 g diphenylamint lassan feloldunk 200 ml 99,8 %-os jégecetben. A teljes feloldódás után 120 ml conc. p.a. HCl-t adunk hozzá. A reagens sötét, üveg dugós üvegben, jég szekrényben tárolva néhány napig eltartható. A legtöbb diphenylamin készítmény szennyezett, ezeket előzőleg kétszer vagy háromszor át kell kristályosítani meleg alkoholból, féltérfogatnyi desztillált víz hozzáadásával.

5/ Az élesztőzés kivitelezése: 20 g kereskedésbeli élesztőt nagy centrifugacsőben 100 ml fiziológias konyhasóban szuszpendálunk: lecentrifugáljuk, a folyadékot elöntjük, s az élesztőt újra 100 ml fiz. konyhasóban szuszpendáljuk. Alaposan elkeverjük és újra centrifugáljuk. A mosást összesen háromszor ismételjük meg. Az élesztő kimosása akkor tökéletes, ha az utolsó centrifugálás után a fennmaradó folyadék áttetsző és redukciós próbákat nem ad. Végül az élesztőt újra szuszpendáljuk 100 ml fiz. konyhasóban. Ezáltal 20 %-os élesztőszuszpenziót nyerünk. Jég szekrényben tároljuk. Ha aznap nem használjuk fel a teljes mennyiséget, úgy használat előtt még egyszer szuszpendáljuk és centrifugáljuk. Centrifugacsőbe vizzünk 2 ml szérumot, hozzáadunk 6 ml élesztőszuszpenziót, jól összekeverjük és szobahőmérsékleten 15 percig állni hagyjuk. Ezalatt 3-4-szer felrázzuk. 15 perc állás után centrifugáljuk és az élesztőszótt szérumot száraz kémcsőbe átpipettázzuk.

6/ Heparin: 6 %-os heparin oldatból /Kőbányai Gyógyszergyár, Budapest/ 0,6 mg/ml koncentrációjú törzsoldatot készítünk.

A kívánt koncentrációjú oldatok előállítása a törzsoldat desztilláltvízzel való hígításával történik.

Kivitelezés

1 ml élesztőzéssel glukoz-mentesített szérumot 5 %-os trichloreccetsavval, vagy ZuSO_4 -tal fehérjementesítünk./ 1 ml élesztőzött szérum + 9 ml 5%-os trichloreccetsav, vagy 1 ml élesztőzött szérum + 7 ml desztillált víz + 1 ml 10 %-os ZuSO_4 + 1 ml 2 %-os NaOH. Azonnal szűrjük./ Ezután 1 ml szérumszűrlethez 6 ml diphenylamin reagenst adunk bürettából, és a csöveket pontosan 35 percre forrásban lévő vízfürdőbe helyezzük. A víz-nívó magassága minden esetben érje el, de ne haladja meg lényegesen a csövekben lévő folyadék felszínét.

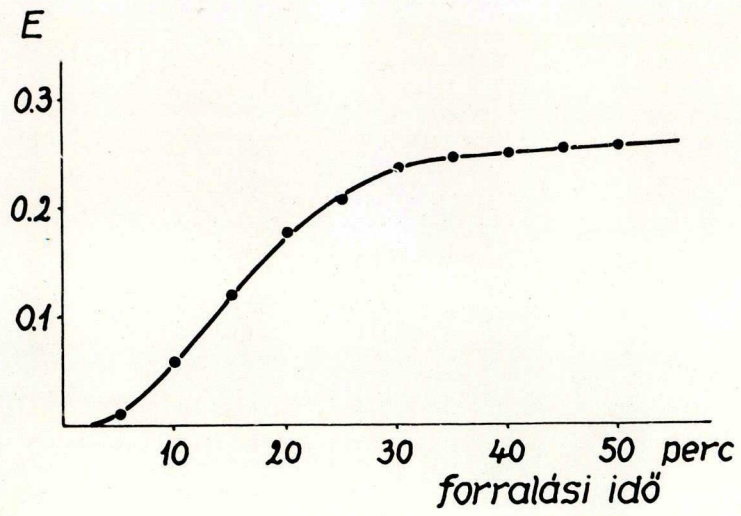
Az időt /35 perc/ mindig attól az időponttól számítjuk, amikor a beemelés után a vízfürdő újból forrni kezd.

A 35 perc letelte után a csöveket hideg vízfürdőbe rakjuk át és szobahőmérsékletre hűtjük. A kifejlődött kékes-lila szín intenzitását Stufon S₅₃-as színezőrőnél 2 cm-es küvettában vakpróbával szemben fotometrizáljuk.

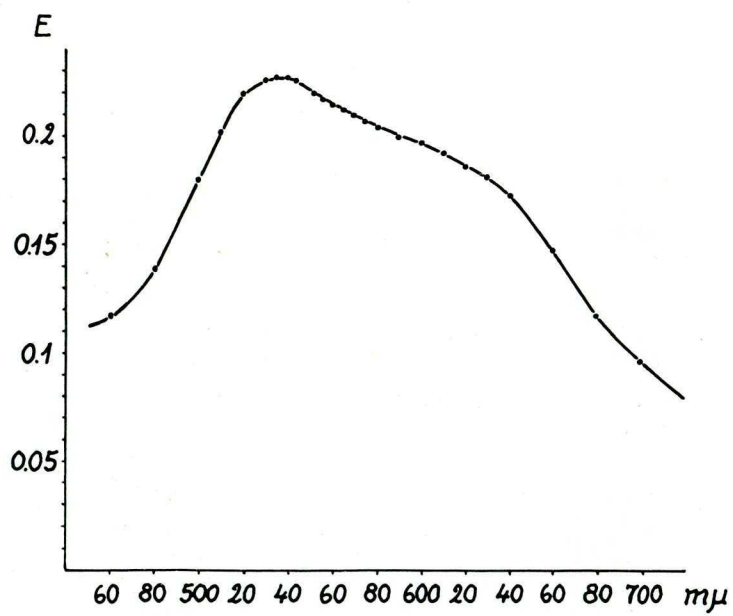
Vakpróba: A meghatározás kivitelezésével teljesen azonos, csak a szérum helyett desztillált vizet használunk.

Forralási idő hatása

A meghatározás kivitelezésénél a forralási időt /35 perc/ pontosan be kell tartani, mivel a szín intenzitása a forralási időtől függő. Mint az 1. ábrán látható 30 és 40 perc között az E nem változik. A 40.



1. ábra



2. ábra

percnél tovább folytatva a hidrolizist az extinkció kis-
mértékben emelkedik, amely valószínűleg az oldat bekon-
centrálódása miatt jön létre.

Abszorpciós spektrum

A heparin diphenylamin-reagenssel főzve a sósav
és a jégecet hatására hidrolizist szenved. Hidroliziskor
glucose egységekre bomlik, melyek a diphenylaminnal azon-
nal reakcióba lépnek és az ily módon keletkezett konden-
zációs termék kékes-lila színű /glucosenal kék/.

A szín abszorpciós spektrumának felvételére
0,26 mg/ml heparint használtam. Az elnyelés maximuma $530\text{m}\mu$ -
nál van /2. ábra/. Ezért a szín intenzitásának meghatáro-
zására Stufon S_{53} -as színezűrt használunk.

A koncentráció és az extinkció közötti összefüggés

Heparin törzsoldatból hígítási sorozatot ké-
szítve, s ezek 1 ml-ével elvégezve a meghatározást, a ka-
pott kalibrációs görbe lineáris, azaz az extinkció ará-
nyosan változik a koncentrációval, tehát a Beer-Lambert
törvényt követi /3. ábra/.

A szérumfehérjék kicsapásához 5 %-os trichlor-
ecetsavat, vagy $\text{ZnSO}_4 + \text{NaOH}$ -t használunk. Mindkét fehérje
kicsapószerrel elvégezve a meghatározást, azonos ered-
ményhez jutunk.

Mint említettem, a glucose zavarja a meghatáro-
zást. Zavaró hatásának kiküszöbölésére a szérum vagy a
plazma élesztőzését használjuk föl. Heparint tartalmazó

oldattal a szérumba leírt élesztőzés elvégzése után a meghatározást elvégeztem.

Vizes heparin oldattal kapott eredmények megegyeztek az élesztőzött heparinnal kapott értékekkel, tehát az élesztő nem befolyásolja a meghatározást.

A szín stabilitása

A diphenylaminnal előhívott szín nem stabilis. A lehülési időtől /kb. 10 perc/ számítva a szín stabilitása a 13. percig állandó, ettől kezdve az extinkció növekedni kezd, mivel az oldatból kiváló csapadék azt zavarossá teszi. 0,30 mg/ml heparin oldattal elvégezve a meghatározást az eredményeket az I. táblázat szemlélteti.

Idő /perc/	E
0	0,30
5	0,30
10	0,30
13	0,31
18	0,32
33	0,41
38	0,47

A lehülési időtől számítva kb. 13-15 perc alatt a fotometrizálást el kell végezni.

I. táblázat

Eredmények

A heparinnak a szérumfehérjéhez való kötődésének vizsgálatára a fent kidolgozott módszer alkalmasnak bizonyult. Mint a vizsgálatokból megállapítottam, az élesztő nem köti meg a heparint. Azonos eredményhez jutottam, ha a szérumhoz élesztőzés előtt vagy a már élesztőzött szérumhoz adtam hozzá a heparint.

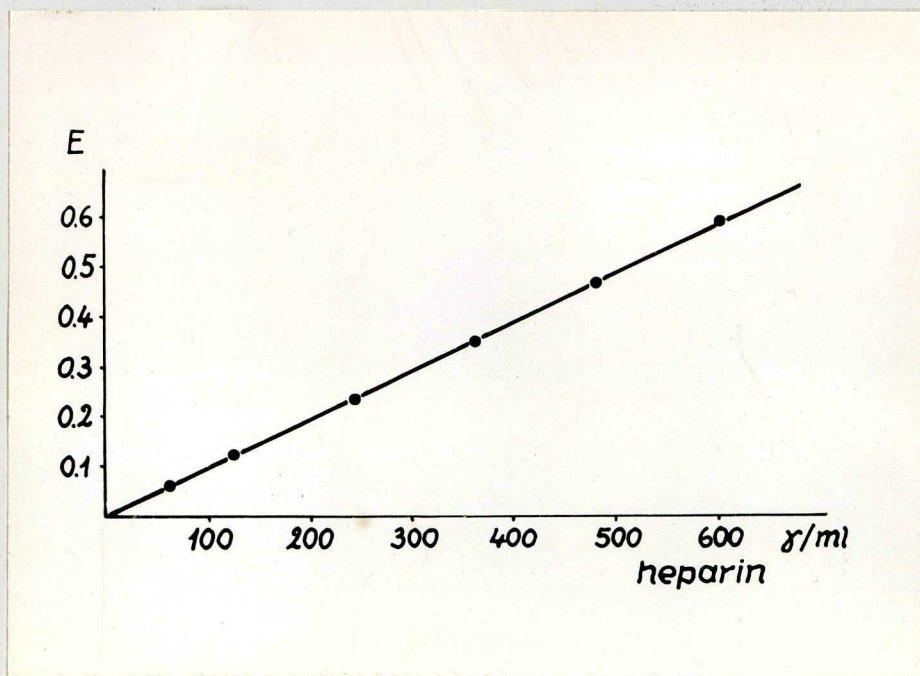
Ezen kérdés eldöntésére 1 ml szérumhoz 1 ml különböző koncentrációjú heparint adtam és 6 ml élesztő szuszpenziót. Az így kapott eredmények megegyeznek azokkal az értékekkel, amelyeket akkor kaptam, ha az élesztőzés elvégzése után / a fentebb leírt módszer szerint: 2 ml szérum + 6 ml élesztő/ az élesztőzött szérumhoz adtam hozzá a heparint. A kivitelezéshez ez utóbbi módszert alkalmaztam. Az élesztőzött szérum 1 ml-éhez/0,25 ml szérumnak felel meg/ 1 ml különböző koncentrációjú /1,2,3,4 mg/ml/ heparin oldatot adtam. Összekeverés és 30 perc állás után a fehérjéket kicsaptam. Ugyanazon gyűjtött emberi szérumból készített minták egyik sorozatából a fehérjéket 5 %-os TCA-val, a másikkól $\text{ZnSO}_4 + \text{NaOH}$ -val választottam le. A csapadékot azonnal leszűrtem és a szűrlet 1 ml-ével végeztem el a meghatározást. A fehérjék a heparinhoz kötődve komplex-sót képeznek.

A komplexbe vitt heparin /az u.n. kötött heparin/ mennyisége azonos fehérje koncentráció mellett egyrészt az oldatban jelenlévő heparin mennyiségétől, másrészt az oldat pH-jától függ. A fehérjék kicsapásakor a komplexbe vitt heparin a fehérjékkel együtt kiválik az oldatból, s a kötött heparin a fehérjecsapadékban lesz.

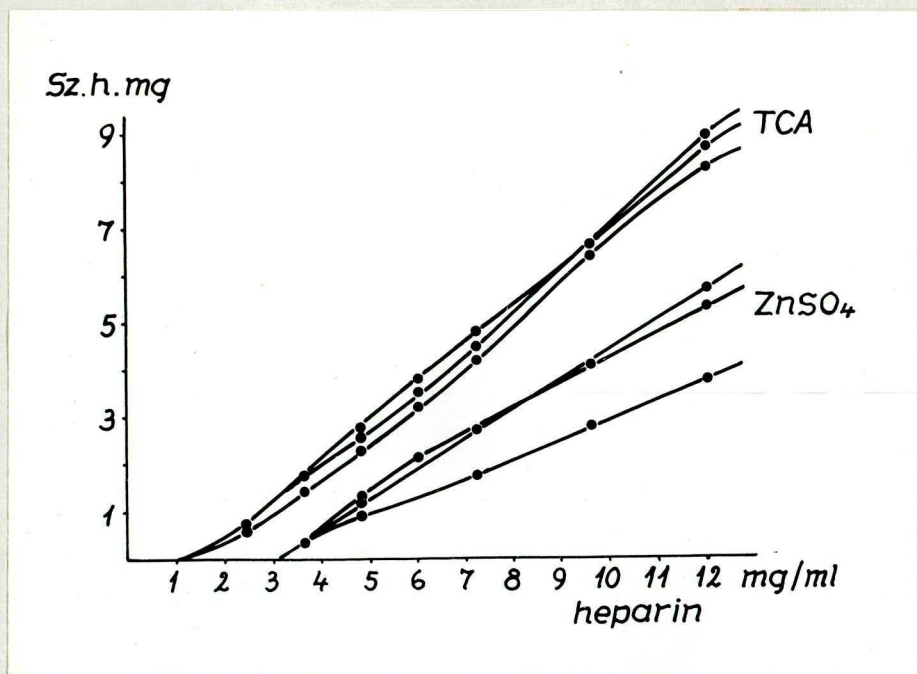
A fehérjék által meg nem kötött u.n. szabad heparin a fehérje - heparin komplex kicsapása után az oldatban marad.

A fentebb leírt módszerrel az oldatban maradó szabad heparin koncentrációja határozható meg.

A szabad heparin mennyiségének változását - 3 különböző szérummintával elvégezve a kísérletet - a 4. ábra



3. ábra



4. ábra

szemlélteti. Az abszcisszára a szérumhoz hozzáadott heparin mennyiségét mg/ml-ben, az ordinátára a szabad heparin mennyiségét mg-ban kifejezve ábrázoltam.

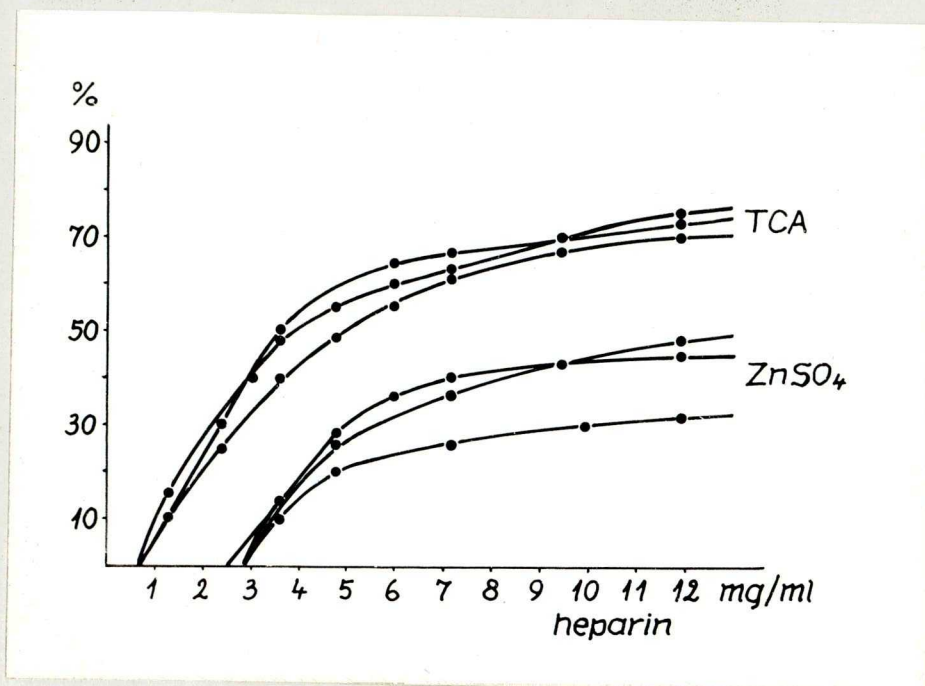
A szabad heparin mennyisége, mint az az ábrából kitűnik, azonos a fehérje koncentráció mellett az oldatban lévő heparin koncentrációtól és a pH-tól függő.

A trichloreccetsavval történő kicsapásnál a szűrletben a pH 1-2 között változik, míg a $\text{ZnSO}_4 + \text{NaOH}$ kicsapószer alkalmazása mellett 6-7 között. Erősen savanyu közegben /TCA kicsapás/ a szabad heparin mennyisége nagyobb mint a ZnSO_4 -os kicsapás esetén. Mindkét esetben a görbék lefutása nagyjából azonosnak mondható! Alacsonyabb heparin koncentrációknál TCA alkalmazásánál 0,5 mg/ml; $\text{ZnSO}_4 + \text{NaOH}$ használatánál 2,5 mg/ml heparin koncentráció alatt heparin nem volt kimutatható az oldatból. Növelve a heparin koncentrációját, a szabad heparin mennyisége is nő.

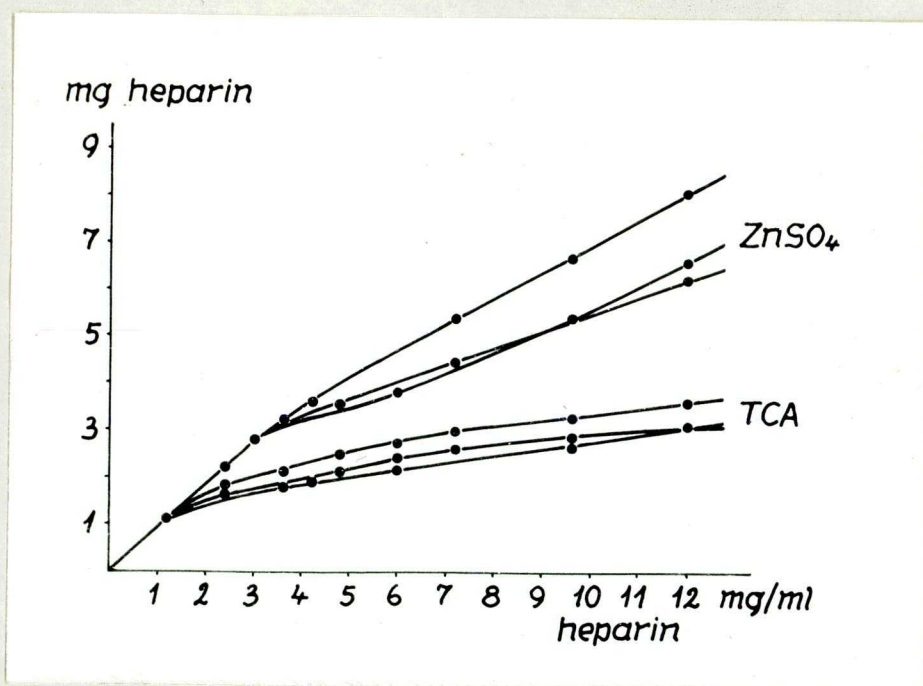
Az 5. ábra a szabad heparin mennyiségének változását tünteti fel a hozzáadott heparin koncentráció %-ban kifejezve. Minél több heparint adunk a fehérjéhez, a szabad heparin %-os aránya annál nagyobb.

A szérumhoz hozzáadott heparin és a szabad heparin közötti koncentráció különbség a fehérjék által komplexbe vitt kötött heparin. A 6. ábra a kötött heparin mennyiségének változását szemlélteti a hozzáadott heparin mg/ml függvényében.

A fehérjék által sókötésbe vitt heparin mennyi-



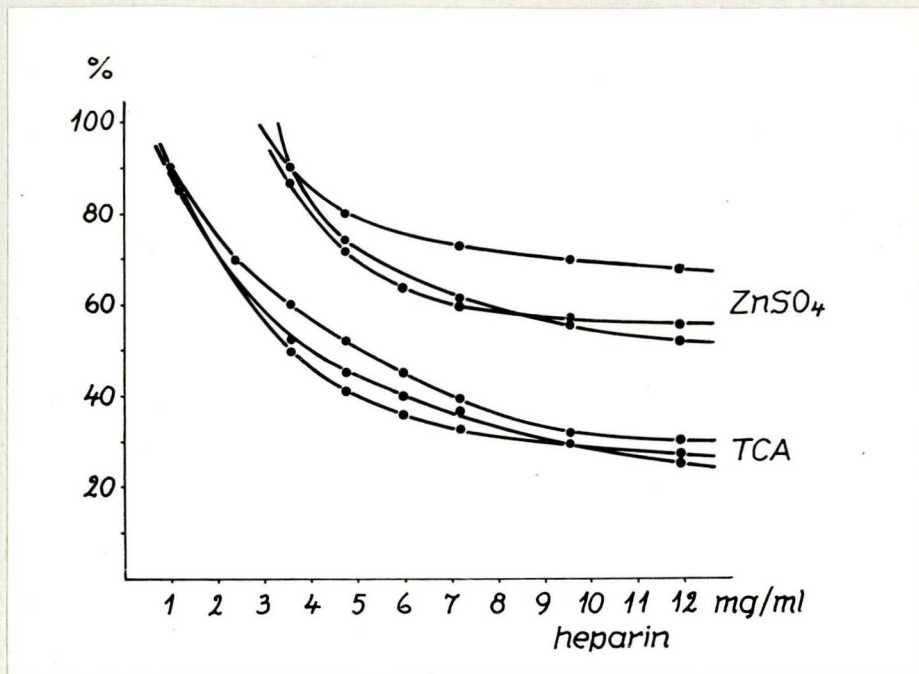
5. ábra



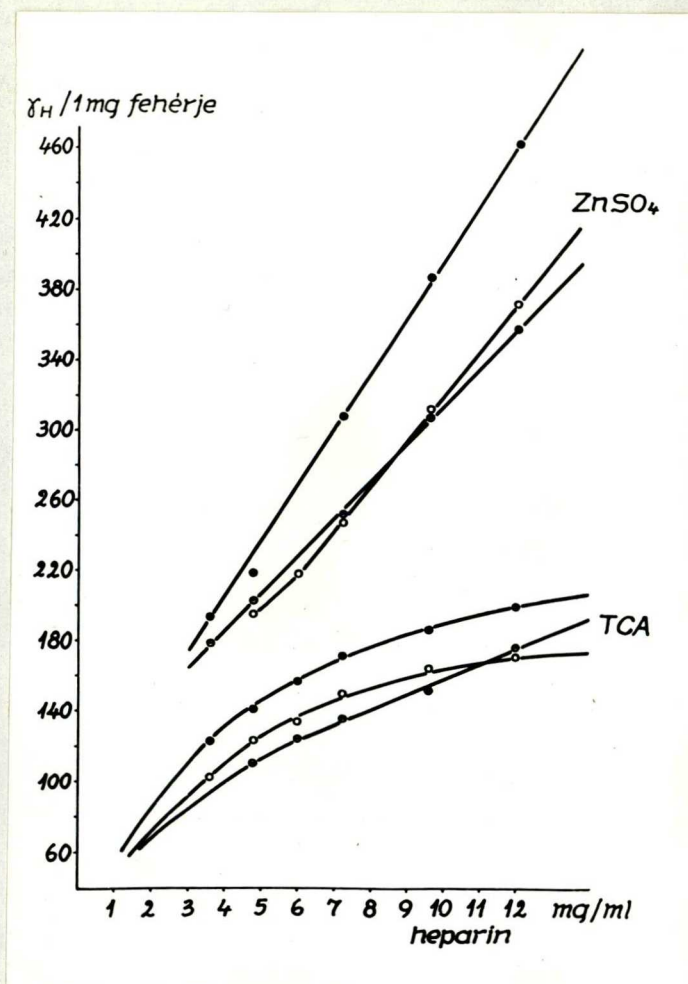
6. ábra

sége a $\text{ZnSO}_4 + \text{NaOH}$ -val való kicsapás esetén nagyobb mint a TCA-val történő kicsapással. Minél nagyobb a heparin koncentrációja az oldatban, annál nagyobb a kötött heparin értéke mg-ban kifejezve. A TCA-s kicsapásnál 0,5, a ZnSO_4 -os kicsapásnál 2,5 mg/ml hozzáadott heparin koncentrációig a bemért heparin teljes mennyisége a fehérjékhez kötődik; a görbék ezen szakaszai lineárisak. Az előbbi esetben 10-12 mg/ml kiindulási heparin koncentrációnál a görbék alig emelkednek, tovább növelve a heparin mennyiségét az oldatban, a fehérjék már nem kötnek meg több heparint. A $\text{ZnSO}_4 + \text{NaOH}$ -dal való kicsapásnál ezen koncentrációnál a görbék még emelkedő tendenciát mutatnak; a koncentráció növelésével növekszik a kötött heparin mennyisége. A kiindulási heparin koncentráció %-ában kifejezve a kötött heparin mennyiségét a 7. ábra tünteti fel. A TCA-val történő kicsapásnál a görbék alacsonyabban futnak, a csökkenés mértéke nagyobb.

Mivel a jelen kísérletben nem ismerjük a fehérjék azon mennyiségét, amelyek a heparinnal sóit képeznek, ezért csak az egységnyi fehérje mennyiségre eső heparin mg értéke adható meg /8. ábra/. Az abszcisszán a hozzáadott heparin koncentrációját mg/ml-ben, az ordinátán az 1 mg fehérjére eső heparin mennyiségét ábrázoltam mg értékekben. A TCA-val történő kicsapásnál a görbe alakja nem lineáris. Az oldat heparin koncentrációjának növelésével növekedik az egységnyi fehérje mennyiségre jutó heparin érték, egy telítettségi értékig. A ZnSO_4 -os kicsapásnál a vizsgált tartományban a görbék lefutása lineáris; az egységnyi fehérjére eső heparin arányosan változik a heparin koncentrációval.



7. ábra



8. ábra

Ha az egységnyi fehérje mennyiségre eső kötött heparint nem a szérumhoz hozzáadott heparin koncentráció függvényében, hanem a fehérjék által sókötésbe vitt u.n. kötött heparin függvényében ábrázoljuk, úgy mindkét esetben a görbék lefutása lineáris /9. ábra/. Mind a TCA, mind a $ZnSO_4$ -os kicsapás esetén a három különböző szérum mintából kapott eredmények ugyanazon egyenesre estek. Az II. táblázat a TCA, a III. táblázat a $ZnSO_4 + NaOH$ -val való kicsapás esetén szemlélteti az 1 mg fehérjére eső heparin mennyiségét γ - ban kifejezve, 3 különböző szérum minta esetében.

	1		2		3	
hozzá- dott hep.mg/ml	kötött hep.mg	γ /1 mg fehérje	kötött hep.mg	γ /1 mg fehérje	kötött hep.mg	γ /1 mg fehérje
1,2	1,08	61,5	1,02	58	1,08	61,5
2,4	1,68	96,0	1,68	86	1,80	96,0
3,6	1,8	103,0	1,8	103	2,16	124,0
4,2	1,9	108,0	-	-	-	-
4,8	1,96	112,0	2,17	124	2,5	143,0
6,0	2,16	124,0	2,4	137	2,76	158,0
7,2	2,4	137,0	2,64	150	3,0	172,0
9,6	2,68	153,0	2,88	164	3,3	188,0
12,0	3,12	178,0	3,0	172	3,6	205,0

II. táblázat

	1		2		3	
hozzá- adott hep.mg/ml	kötött hep.mg	γ /1 mg fehérje	kötött hep.mg	γ /1 mg fehérje	kötött hep.mg	γ /1 mg fehérje
3,6	3,24	196	3,24	196	3,13	180
4,8	3,84	220	3,6	205	3,48	198
6	4,74	270	4,03	230	3,84	220
7,2	5,4	310	4,44	253	4,4	250
9,6	6,73	390	4,57	310	5,46	312
12	8,16	465	6,24	360	6,6	375

III. táblázat

Fischer és Astrup /62/ azt találták, hogy a thromboplastin - heparin komplex között stöchiometria arányok állnak fenn és ez az összefüggés más proteinekre is vonatkozik. Több szerző hasonló eredményre jutott, így Jaques /1943/ /65/ kimutatta, hogy a heparinnak caseinnel, protaminnal, toluidinkéssel és más nem protein típusú bázikus anyagokkal kapott eredményei a disszociációs konstans értékére /K/ nagyjából megegyeznek.

Fehérje + heparin = fehérje-heparin

$$K = \frac{[C_F] \cdot [C_H]}{[C_{FH}]} = c \cdot \frac{a - (b - c)}{(b - c)}$$

A képletben feltüntetett betűk jelentése:

a = a hozzáadott fehérje koncentráció

b = a hozzáadott heparin koncentráció

c = a szabad heparin koncentráció

b-c = a keletkezett reakció termék

a-b-c/ = a szabad protein koncentráció

A IV. táblázat a fentemlitett képlet alapján kiszámított K értékeket tünteti fel TCA és ZnSO_4 -os kicsapás esetén, három különböző szérumból mintával kapott eredmények alapján. A TCA-val való kicsapásnál a heparin koncentráció növekedésével a K értéke nő, azaz a keletkezett fehérje-heparin komplex stabilitása csökken. A ZnSO_4 -tal való kicsapásnál a K értékek nagyjából megegyeznek.

hozzá- adott heparin mg/ml	TCA			$\text{ZnSO}_4 + \text{NaOH}$		
	Disszociációs konstans/K/			Disszociációs konstans /K/		
	1	2	3	1	2	3
1,2	0,85	0,735	0,85	-	-	-
2,4	3,0	3,0	2,32	-	-	-
3,6	6,95	6,95	4,4	0,62	0,62	0,87
4,8	9,75	7,85	5,75	0,99	1,72	1,84
6,0	10,6	9,95	7	1,25	2,3	2,8
7,2	12,6	11,7	8	1,06	2,65	2,75
9,6	15,5	13,6	10,8	1,11	2,55	2,55
12,0	17,3	15,7	11,8	1,06	2,4	1,73
középérték:				1,16	2,32	2,34

IV. táblázat

Kérdés, hogy a teljes vér, a vörösvértestek, plazma és szérumból ugyanazon mennyiségű milyen mértékben kötik meg

a heparint, és van-e különbség a kötődés mértékében aszerint, hogy citráttal vagy oxaláttal vesszük le a vért. A kérdés eldöntésére ugyanazon személytől citráttal, oxaláttal és alvadésgátló anyag hozzáadása nélkül vettünk le vért. A teljes vér, vörösvértestek, plazma és szérum 0,5 - 0,5 ml-éhez heparint adtam /0,1 ml 60 mg/ml = 6 mg/ml; és 0,3 ml 60 mg/ml = 18 mg/ml/. 30 perc állás után, 4 ml-re egészítettem ki a térfogatot élesztőszuszpenzióval. Az élesztőzés befejezése után a centrifugátum 1 ml-éhez 4 ml 5 %-os TCA-t adtam és ezt követően a szűrlet 1 ml-ével végeztem el a meghatározást.

Az V. táblázat a szabad heparin, a VI. táblázat a kötött heparin mennyiségét tünteti fel. A kísérlet alapján az adódott, hogy a vörösvértestek egyáltalán nem kötnek meg heparint.

	6 mg/ml		18 mg/ml	
	SzH mg	SzH %	SzH mg	SzH %
teljes vér oxalátos	0,96	16	9,72	54
teljes vér citrátos	1,28	21,4	9,96	55,3
oxalátos plazma	1,15	19,2	9,9	55
citrátos plazma	0,96	16	9,8	54,4
szérum	1,31	22	10	55,5

V. táblázat

SzH mg = szabad heparin mg

SzH % = a szabad heparin mennyisége a hozzáadott heparin mg %-ban

	6 mg/ml		18 mg/ml	
	KH mg	KH %	KH mg	KH %
teljes vér oxalátos	5,04	84	8,28	46
teljes vér citrátos	4,72	78,6	8,14	44,7
oxalátos plazma	4,85	80,8	8,10	45
citrátos plazma	5,04	84	8,22	45,6
szérum	4,69	78	8	44,5

VI. táblázat

KH mg = kötött heparin mg

KH % = kötött heparin mennyisége a hozzáadott heparin %-ban

A citráttal és oxaláttal levett teljes vér és plazma fehérjék heparin megkötőképessége azonosnak mondható, csak a szérumnál kaptam minden esetben valamivel kisebb értéket.

A heparin-fehérje kötődés vizsgálata a pH függvényében

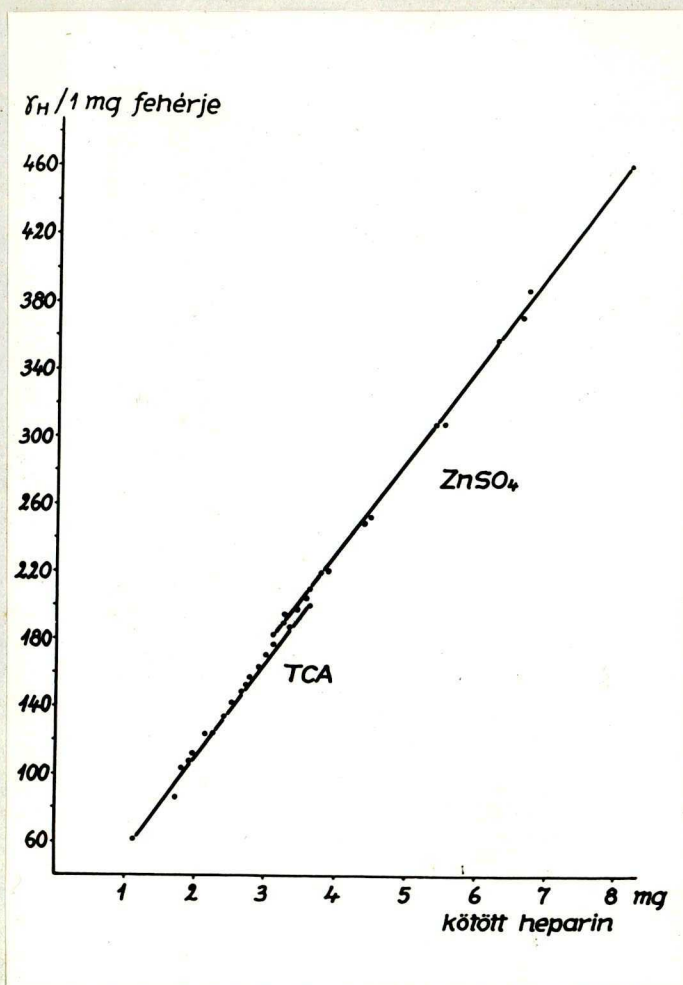
Azon kérdés eldöntésére, hogy a heparin és a szérumfehérjék egymásközötti reakciója a pH függvényében hogyan változik, papirelektroforezis kísérletet végeztem. A futtatás különböző pH-ja 1/15 M-os KH_2PO_4 - Na_2HPO_4 puffer elegyben történt. A futtatási idő: 3,5 óra. $V=300$ volt. Iónerősség: 0,5. Az elektroforézisben használt papir: Schleier-Schul 2043/b. /1:4 arányban hígított olyan fehérje oldatokat készítettem, amelyben a heparin koncentráció 1, 2, 3, 4 mg/ml volt. Ezen oldatok 0,025 ml-ét vittem fel 5 cm széles papírcsikokra. A futtatás és az ezt követő

megszáritás után /60-80°C/ a papíresikokat két részre osztva egyiken a fehérjét, a másikon a heparint hívtam elő. A fehérjék előhívására az általánosan használt savanyu-fukszinosz eljárást és 10 %-os ecetsavval való differenciálás módszerét alkalmaztam. A heparin előhívására használt oldat: 0,05 %-os toluidinkék 5 %-os ecetsavban. Differenciálás 10%-os ecetsavval történik.

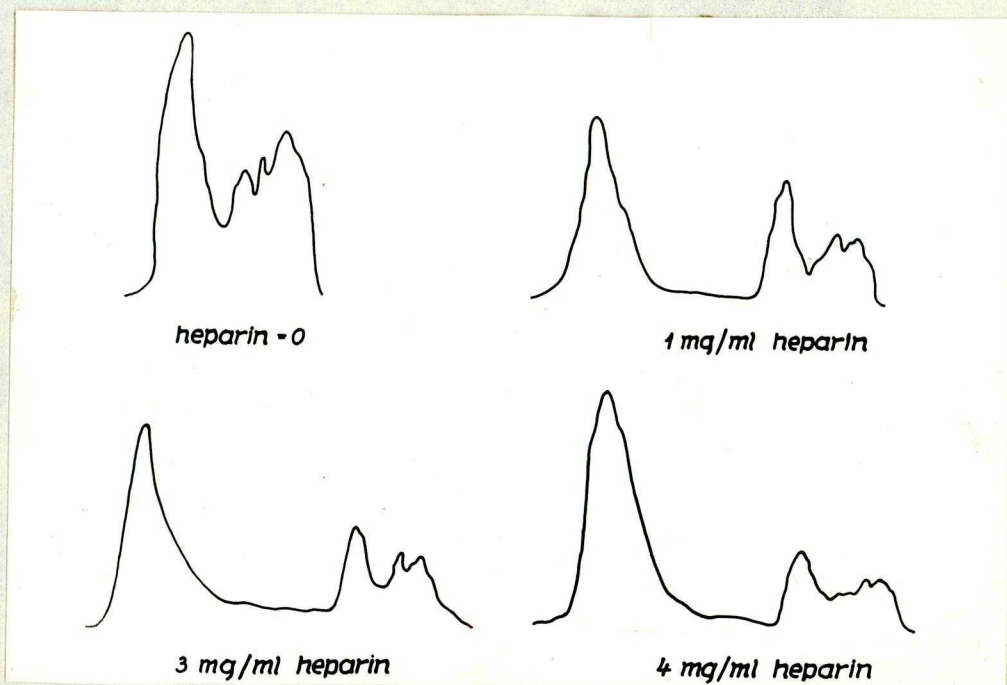
Elektroforétikus vizsgálatok

Különböző pH-ju 1/15 M-os KH_2PO_4 - Na_2HPO_4 puffer-elegy használata mellett 3,5 óra futtatási idő alatt a fehérjék nem válnak szét tökéletesen frakciókra, illetőleg a globulinok nagyjából egy foltban jelennek meg az albumintól elkülönülve. A kísérlet célja különben sem az, hogy megállapítsam a heparinnak a különböző fehérje frakciókhoz való kötődésének mértékét, hanem a szérumfehérjéknek, mint egységese egésznek a heparinhoz kötődött mennyiségét a pH függvényében vizsgáljam.

A fehérjéhez különböző koncentrációban heparint adva /a fentebb közölt leírás szerint/ a heparin megváltoztatja az elektroforétikus képet /10. ábra/. Egy új komponens jelenik meg az albumin leszálló ága mellett, amely sokkal gyorsabban vándorol, mint az albumin. Ez az új komponens a fehérje-heparin komplex. A fehérjét és a heparint külön-külön előhíva a heparin teljes mennyisége és a fehérjének egy része azonos foltnál jelenik meg. Szabad heparin nem mutatható ki, mivel a kísérleti körülmények között nem lép



9. ábra



10. ábra

fel észrevehető különbség a heparin és fehérje-heparin komplex mobilitásában. Ezt bizonyítja az a tény, hogy tiszta heparin és fehérje-heparin oldatot elektroforizálva a heparin és a fehérje-heparin komplex mobilitása azonos volt.

Különböző pH-ju pufferoldatban elvégezve az elektroforézises vizsgálatokat a kapott eredményeket a 11. ábra tünteti fel. Az abszcisszára a pH-t, az ordinátára a komplex fehérje mennyiségét ábrázoltam az összfehérje %-ban kifejezve. A pH növelésével azonos mennyiségű összfehérje és heparin koncentráció mellett a komplexbe vitt fehérje mennyisége pH = 7-ig nő, ezután esökken. Azonos pH és fehérje koncentráció mellett a heparin mennyiségét változtatva a komplexbe vitt fehérje minden esetben növekedik, ha növeljük a heparinkoncentrációt /1,2,3,4 mg/ml/. A pH változásával az elektroforitikus képpen 3,5 óra futtatási idő alatt a fehérje-heparin komplex mobilitásában változás nem mutatható ki.

Megbeszélés

A heparin, mint erősen elektronegatív tulajdonságú anyag az amphoter jellegű fehérjékkel sószerű komplexet képez. A komplexben a fehérje és a heparin közötti kötési viszony egyrészt az oldat fehérje és heparin koncentrációjától, másrészt az oldat pH-jától függ. Ebben a kísérletben a szérumfehérjének mint egységes anyagnak a heparinhoz való kötődését vizsgáltam, eltekintve attól, hogy a szérumfehérjék különböző frakciókra bonthatók. A TCA-val és $\text{ZnSO}_4 + \text{NaOH}$ -val való kicsapás és ezt követően az oldatban jelenlévő

szabad heparin meghatározásából kapott eredmények azt mutatják, hogy a heparin a vérben gyakorlatilag a plazmában, illetőleg a szérum frakcióban helyezkedik el. A vörösvértestek nem kötnek meg heparint.

A szérumban a fehérje-heparin komplex keletkezése adott fehérje mennyiség mellett a heparin koncentrációjától függ. A TCA-val történő kicsapásnál 0,5, a $ZnSO_4 + NaOH$ -val való kicsapásnál 2,5 mg/ml hozzáadott heparin koncentráció alatt szabad heparin nem volt kimutatható, a heparin teljes mértékben fehérjéhez kötött állapotú. Ennél magasabb koncentrációknál a heparin szabadon is megjelenik az oldatban. Ez a mennyiség biológiai értelemben azt jelenti, hogy egy normális ember keringő plazmafehérjéi átlagban 2000-2500 mg heparint képesek olyan módon megkötni, hogy az a fehérjék igen erős denaturálására /TCA, $ZnSO_4$ kicsapás/ sem válik le.

Ilyen nagy mennyiségben heparin fiziológiai körülmények között sohasem szabadul fel a szervezetben, de terápiás alkalmazáshoz is ennek csupán 1/20-át juttatjuk be.

Ez tehát azt jelenti, hogy a vérben előforduló heparin gyakorlatilag mindig és teljes mértékben fehérjéhez kötött állapotú és így fejt ki hatását.

Az eredmények egyeznek Eiber /64/ legújabb izotop kénnel jelölt heparinnal végzett kísérleteivel. Eiber kimutatta, hogy heparin- S^{35} -öt intravénásan beadva a vérben megjelenő heparin majdnem teljes egészében a vér plazma illetve a szérum frakciójában van, TCA-val vagy alkohollal való kicsapásnál pedig a csapadékban. Másrészt Monkhouse és Jaques /44/, valamint Freeman /43/ kísérleti eredményei-

vel, akik az általuk kidolgozott heparin meghatározási módszerekkel csak fehérjéhez kötött heparint tudtak kimutatni, szabad heparin jelenléte nem volt észlelhető.

Kérdés, mi az oka annak, hogy a TCA-val történő fehérje kicsapásnál a komplexbe vitt u.n. kötött heparin mennyisége kisebb mint a ZnSO_4 -os kicsapás esetén. Mint már említettem, a heparin és a fehérjék közötti reakció a pH-tól függ. A fehérjék az u.n. amphoter elektrolitokhoz tartoznak, carboxyl és amino csoportokat tartalmaznak, s az oldat pH-jától függően mint savak vagy mint bázisok disszociálnak. A szérumfehérjék TP-ja a semleges pontnál valamivel savanyubb pH értéknél van. Ha a pH értéke alacsonyabb az izoelektromospontnál, úgy a fehérjék savi disszociációja visszaszorul, ugyanakkor fokozódik a lúgos disszociáció. A fehérje pozitív töltésű lesz, mint bázis viselkedik és a heparin savanyu gyökeivel /carboxyl és szulfát gyök/ sószerű komplexet képez.

A TCA -val történő kicsapásnál az oldat pH-ja pH=1-2 között változik, és a kötött heparin mennyisége kisebb mint a $\text{ZnSO}_4 + \text{NaOH}$ -val való kicsapásnál, amelynél a szűrlet pH-ja pH = 6-7. Ez a tény azzal magyarázható, hogy erősen savanyu közegben a fehérjék a bázisos disszociációja erősen fokozódik, de ugyanakkor a heparin savas disszociációja visszaszorul. A sóképződés tehát kisebb mértékű lesz, mint pH=6-7 között, amely pH mind a fehérjék, mind a heparin disszociációját elősegíti.

A fehérjék kicsapása folyamán azok denaturálódnak.

nak. A denaturálás a fehérjék egy részének új pH-t ad, általában a lugosabb tartomány felé tolódik el. Ez a pH eltolódás azonban nem befolyásolja lényegesen a heparin kötődésének mértékét.

Fischer /62/ szerint, ha a heparin a denaturálás alatt jelen van az oldatban, úgy lényegesen nagyobb a fehérjék heparinhoz való affinitása, valószínűleg amiatt, hogy az elsődleges kötéserők mellett /sókötés/ a heparin van der Waals erőkkel is kötődik a fehérjékhez. Ez utóbbi azonban nem valószínű, mert a ZnSO_4 -os kicsapásnál a disszociációs konstansok állandónak vehetők. Ha viszont van der Waals erőkkel is kötődnek a heparin a fehérjékhez, úgy a K értékében sokkal nagyobb változásoknak kellene fellepni, mivel a másodlagos kötéssel létrejövő adszorpciók termékek kevésbé stabilisak, a disszociációs konstans értéke nem lenne állandó. A TCA kicsapásnál a disszociációs konstans fokozatos növekedése inkább a már fentebb említett pH viszonyokkal magyarázható. Erős savak, mint a trichloreccsav is meglehetősen gátolják a heparin-fehérje komplex képződését, sőt a heparin koncentrációját növelve a keletkező só stabilitását mégjobban csökkentik. Ugyanerre a tényre enged következtetni az 1 mg fehérjére eső heparin mennyiségi változásának a vizsgálata is. A szérumhoz hozzáadott heparin mennyiségének függvényében ábrázolva az egységnyi fehérjére eső kötött heparint, a TCA kicsapásnál a görbék az abszcissza felé hajlanak, ZnSO_4 -nál lineárisak. A kötött heparin függvényében ábrázolva mindkét esetben a görbék lefutása lineáris. Ha a heparin a fehérjékhez van der

Waals erővel kötődne, úgy a görbék menete nem lenne lineáris. A denaturálás folyamán fellépő nagyobb mértékű reakció a fehérje és a heparin között azzal magyarázható, hogy a denaturálás folyamán carboxyl és amino csoportok szabadulnak fel. Ha heparin is jelen van az oldatban, úgy előtérbe kerül a fehérje-heparin közötti reakció és kisebb mértékű a fehérjék inter- vagy intramolekuláris reakciói. Sajnos a fentiekben közölt módszer magában foglalja ezen denaturálás folyamán létrejövő fokozott mértékű reakciót a fehérje és a heparin között. Mésrészt a már denaturált fehérjék a heparint adszorpció révén is megkötik. Ezt a lehetőséget oly módon küszöböltem ki, hogy a denaturált fehérjéket a kicsapás után rögtön szűrtem.

A heparin a fehérjék elektroforetikus képét megváltoztatja. A fehérje-heparin komplex mint új komponens a fehérjéktől elkülönülve jelenik meg, mobilitása nagyobb mint az albumin vándorlási sebessége, de azonos a leírt kísérleti feltételek mellett a heparin mobilitásával. A pH változásával a keletkezett komplex mobilitásában nem mutatható ki változás, míg a komplex összetétele a pH-tól függő.

Azonos heparin és fehérje koncentráció mellett a pH növelésével az új komponens fehérje tartalma pH=7-ig nő, a lúgos tartományban csökken. Mint már említettem a szűrő fehérjék izoelektromos pontja pH=7-hez közel a savas tartományban van. A fehérje a TP-on, vagy az izoelektromos ponthoz közel a savas tartományban mint bázis viselkedik, és a heparinhoz kötődik. Lúgos tartományban pH=7 felett

a kötődés mértéke csökken, mivel a fehérjék savi disszociációja kerül előtérbe, és mint ilyen az ugyancsak savas tulajdonságu heparinnal nem lép reakcióba.

Hoch és társa /48/ kimutatták, hogy olyan heparin koncentrációk, amelyek elegendőek a vér alvadásának gátlására, az elektroforetikus képen nem okoznak észrevehető változást. Azt észlelték, hogy 0,1 mg/ml heparin koncentrációnál lép fel először kimutatható változás. A heparin a plazmafehérjék α_2 és β globulin frakcióival képez komplexet. 1-4 mg/ml heparin koncentrációnál a β globulinok kb. 50 %-a, az α_2 globulinok 20-40 %-a volt heparinhoz kötött. Az albuminokkal a reakció kismértékű volt.

Bár 1/15 M-os KH_2PO_4 - Na_2HPO_4 elegyben 3,5 óra futtatási idő alatt a fehérjék nem válnak szét tökéletesen frakcióikra, mégis látható az elektroforetikus képen beállt változásból /10. ábra/, hogy nemcsak a globulinok, hanem az albumin frakció mennyisége is csökkent. Más szerzők is megerősítették már azt a tényt, hogy a heparin a szérumfehérjék albumin frakciójával csak kismértékben reagál, s nagyobb heparin mennyiségnél lép csak reakcióba az albuminnal.

A heparin nemcsak a szérumfehérje frakciókkal reagál, hanem nagyfoku affinitást mutat a plazmában aránylag kis koncentrációban jelenlévő fibrinogén frakcióhoz. A következő fejezetben a heparin és a fibrinogén között lejátszódó kémiai illetve fizikokémiai reakciók vizsgálatával foglalkozom.

II. Heparin és protamin hatása a fibrinogén kicsap- hatóságára

Walton /66/ megállapította, hogy a heparin és a fibrinogén reakciója révén keletkező komplex csak a fibrinogén izoelektromos pontja szomszédságában stabilis, és fiziológias feltételek mellett a fibrinogén nem csapható ki az oldatból. Thomas és társai /67/ hasonló eredményre jutottak, tisztított fibrinogénnel, alacsony hőmérsékleten végezve a kísérletet. Ezen szerzők figyelmen kívül hagyták a vizsgált rendszer pH-ját és az ionerősséget. Godal /68/ kísérletei alapján arra a megállapításra jutott, hogy a heparin és a fibrinogén egymással stöchiometria arányban reagálnak. Alacsony ionerősség és kis sósav pH a kicsapódás mértékét megváltoztatja. A heparin nagyobb hatást gyakorol a tisztított fibrinogénre, mint a plazma T-es frakcióra, azaz a tisztított fibrinogén könnyebben kicsapható volt. Nylon és munkatársai /69/ észlelték először, hogy a protamin a fibrinogént a plazmából kicsapja. Fantl és Everard /70/ valamint Portmann és Holden /71/ hasonló eredményre jutottak. Godal /72/ megállapította, hogy fiziológias pH és ionerősség mellett fibrinogén oldatból, vagy plazmából protaminnal kicsapható. Fibrinogén-protamin komplex vízben és sókban oldható. Heparin feleslegével a komplex oldatba vihető.

A heparinnak és a protaminnak a fibrinogénre kifejtett együttes hatásáról az irodalomban nem találunk

közelebbi adatokat. Ez utóbbi vizsgálata azért érdekes mind gyakorlati, mind elméleti szempontból, mert a gyakorlatban a heparin hatásának neutralizálása protaminnal történik.

Az alábbiakban ismertetett kísérletben a heparinnak és a heparin antagonistájának, a protaminszulfátnak külön-külön, valamint a fibrinogénre gyakorolt együttes hatását vizsgáltam.

Módszer

Reagenszek

1/ Phosphat-puffer: 0,005 M natriumphosphat pH = 7.

2/ Különböző pH-ju phosphat puffer: előállítására primer és secunder natriumphosphatoldatok megfelelő arányú elegyítésével történik.

3/ Fibrinogen oldat: a kísérlethez használt fibrinogén a Cohn-féle T-es frakció. Összetétele: fibrinogén: 5 g, teljes fehérje: 8,3 g, glucose: 20 g, natriumcitrat: 4,7 g. A kívánt koncentrációju oldat előállításához megfelelő mennyiségű fibrinogént lemérünk. A száraz anyaghoz óvatosan 0,005 M-es phosphatpuffert adunk anélkül, hogy rázogatóssal vagy keverő mozgással az oldódási folyamatot siettetnénk. 37°C-ra való felmelegítéssel az oldási folyamat gyorsítható. Az anyag ilyen módon 20-30 perc alatt oldódik fel. Oldhatatlan részek mindig maradnak az oldatban, ezért leszűrjük. Az alkalmazásra kész fibrinogén oldatot kb. 2 órán belül fel kell használni, mert ezen időn túl a fibrinogén - szobahőmérsékleten tartva - kiválik az oldatból. 4°C-on egy nap alatt elbomlik, ezért használat előtt mindig frissen készíteni kell.



A száraz fibrinogént 20°C alatti hőmérsékleten fénytől védve tartjuk.

4/ Heparin: 6 %-os heparin oldatból /Kőbányai Gyógyszergyár, Budapest/ 1 mg/ml heparin törzsoldatot készítünk. A kívánt koncentrációju heparin oldat előállítása a törzsoldat hígításával történik. Az oldatok előállítása minden esetben 0,005 M-os natriumphosphat oldattal történik.

5/ Protamin /Hoffmann la-Rache/ 1 mg/ml koncentrációju törzsoldatot készítünk 0,005 M-os phosphatpufferben. A kívánt koncentrációju oldatokat a törzsoldatból hígítással állítjuk elő.

A fibrinogén oldat koncentrációjának meghatározása: Reiner és Cheung által ismertetett módszerrel történik /73/.

Módszer

Heparin-fibrinogén kölcsönhatás vizsgálata

2 ml fibrinogén oldathoz 1 ml phosphatpuffert és 2 ml heparink oldatot adunk. Összekeverjük és pontosan 3 perc állás után a keletkező zavarosságot 1 cm-es küvetta-ban vakpróbával szemben S_{57} -es színszűrő használata mellett Stufon mérjük. Vakpróba: 2 ml fibrinogénoldathoz 3 ml phosphatpuffert adunk. $\text{pH} = 7$ -nél végezve a meghatározást a vakpróba extinctiója nulla. $\text{pH}=7$ -nél alacsonyabb tartományban jól mérhető turbiditás lép fel.

Protamin-fibrinogén kölcsönhatás vizsgálata

2 ml fibrinogén oldathoz 2 ml phosphatpuffert

és 1 ml protaminszulfátot adunk. A keletkezett fābbiditást a fentiekben leirt módon mérjūk vakpróbával szemben.

Protamin és heparin együttes hatásának vizsgálata

2 ml fibrinogénoldathoz 2 ml heparin majd három perc állás után 1 ml protaminszulfát oldatot pipettázunk. Az előálló zavarosságot a heparinnál leirt módon 3 perc állás után határozzuk meg. Az oldatok egymáshoz adási sorrendje a turbiditás nagyságában különböző eredményre vezet, ezt a megfelelő kísérletnél ismertetem.

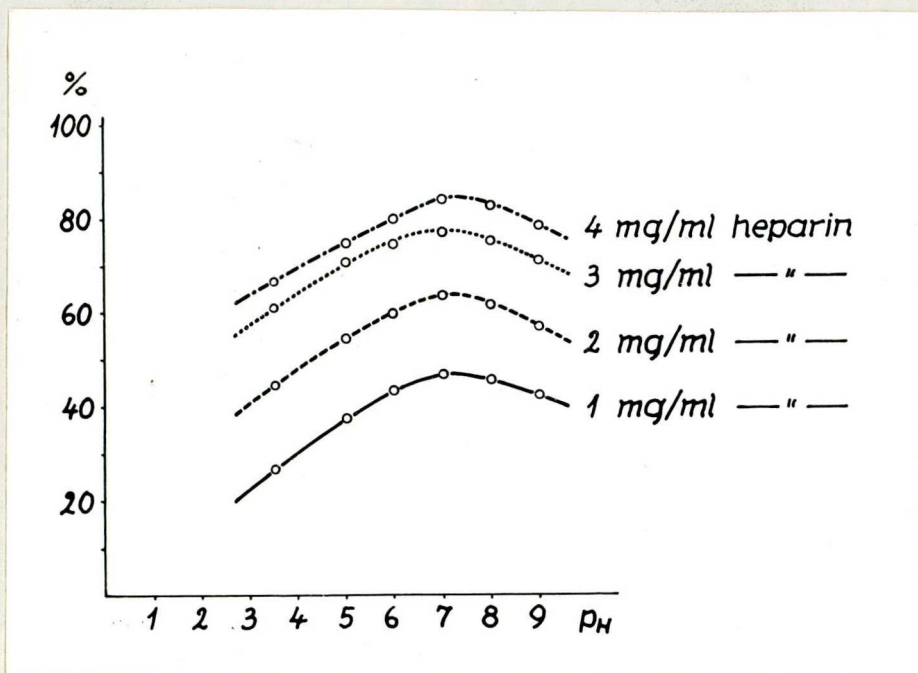
Eredmények

Heparin-fibrinogén kölcsönhatás vizsgálata

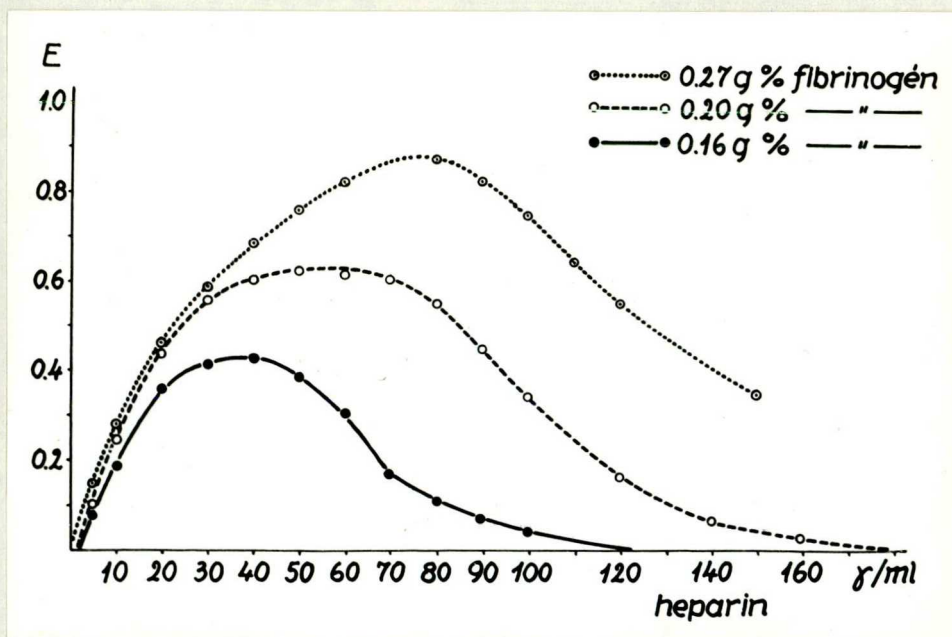
A heparin koncentrációjának hatása

0,005 M-os phosphatpufferben oldott fibrinogénhez pH 7-nél különböző koncentrációju heparint adva a fibrinogén mennyiségétől függő heparin koncentrációnál a kicsapódás maximális /12. ábra/. Tovább növelve az oldat heparin koncentrációját egy adott heparin értéknél az extinctio 0-ra csökken, a heparin-fibrinogén komplex oldatban marad.

A maximális kicsapódás az oldat heparin-fibrinogén molarányától függ. A heparin molekulaszúlyát 16,000 /Jensen, Snellman és Sylven /74//, a fibrinogénét 350,000 /Katz és munkatársai /75// véve a maximális kicsapódásnál a heparin-fibrinogén molarányát az oldatban a VII. táblázat szemlélteti.



11. ábra



12. ábra

Fibrinogén mg%	Heparin δ /ml maximumban	Mólarány az oldatban H:F ^x
90	20	1 : 2,1
160	38	1 : 2
200	50	1 : 1,9
240	63	1 : 1,8
270	78	1 : 1,64

VII. táblázat

Godal /68/ kísérletei eredményei szerint maximális kicsapódás akkor jön létre, ha az oldatban 1 mol heparinre 10 mól fibrinogén jut. Godal kísérleteit tisztított fibrinogénnel és nagyon alacsony koncentrációjú /50 mg%/ nem normál értékű fibrinogén oldattal végezte. Az VII. táblázatban feltüntetett eredményekből látható, hogy az oldat fibrinogén koncentrációját növelve a H:F mólarány a maximális kicsapási pontban csökken. Ha a heparin relative magas koncentrációban van jelen, úgy a heparin-fibrinogén komplex oldatban marad. A VIII. táblázatban feltüntetett mólarányok azon értékek, amelyeknél a kicsapási görbék éppen elérik a 0 értéket, azaz a heparin-fibrinogén komplex már oldatban marad.

x

H = heparin

F = fibrinogén

P = protamin

Fibrinogén mg%	Heparin γ /ml	H:F molarány
90	60	1 : 0,7
160	120	1 : 0,61
200	180	1 : 0,525

VIII.táblázat

A fibrinogén koncentráció hatása

A fentebb feltüntetett eredményekből is látható, hogy a heparin kicsapó hatása a fibrinogén szinttől függ. A maximális kicsapáshoz szükséges heparin mennyisége nő az oldat fibrinogén koncentrációjának növekedésével és a maximumok extinctio értéke is nő /12. ábra/. A heparin-fibrinogén komplex oldatban való maradásához szükséges heparin mennyiségek szintén a magasabb értékek felé tolódnak el, a heparin-fibrinogén molarány tehát csökken az oldatban /VIII.táblázat/.

A maximális kicsapódáshoz szükséges heparin mennyiségét γ /ml-ben különböző fibrinogén szinten a 13. ábra tünteti fel. A görbe nem lineáris, azaz az oldat fibrinogén koncentrációját növelve a komplex kicsapásához relative több heparin kell. Ezzel egyértelmű a H:F molarány csökkenése a maximális kicsapási pontban /VII.táblázat/.

pH hatása

A heparinnal kicsapható fibrinogén mennyisége Godal /68/ valamint Smith /76/ kísérleteivel egyezően az oldat pH-jának függvénye.

Mind a fibrinogén, mind a heparin oldatokat a kívánt pH-ju 0,005 M-os foszfatpufferben készítjük el. Azonos fibrinogén /0,2 g% és heparin koncentráció /10 gamma/ml/ mellett a heparinnak a fibrinogénre kifejtett kicsapó hatását a 14. ábra szemlélteti. pH=7 alatt a fibrinogén heparin hozzáadása nélkül már a puffer hígító hatása következtében kiválik az oldatból. A heparinnak a rendszerhez való hozzáadása ezt az alapzavarosságot megnöveli. A pH növelésével a kicsapódás mértéke csökken, pH=9-nél keletkező komplex már oldható, zavarosság nem keletkezik.

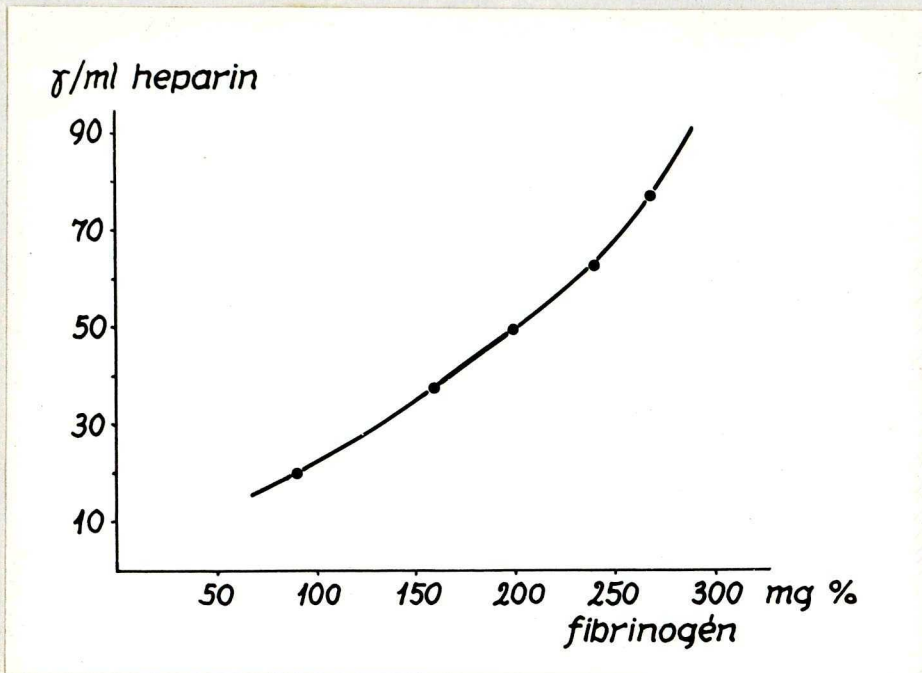
Protamin - fibrinogén kölcsönhatás vizsgálata.

A protaminszulfát mint erősen bázisos fehérje, a fibrinogénnel sószerű komplexet képez. A keletkező komplex az oldatból kiválik, tehát a protamin a fibrinogént oldatából kicsapja. Azonos fibrinogén koncentráció mellett, ha a protamin koncentrációt növeljük a turbiditás nő. A fibrinogén mennyiségének növelésével a zavarosság szintén nő /15. ábra/. 100 γ /ml protamin koncentráció felett nem kapunk értékelhető eredményt, mivel három perc állás alatt a komplex csapadék képződés közben kiválik az oldatból.

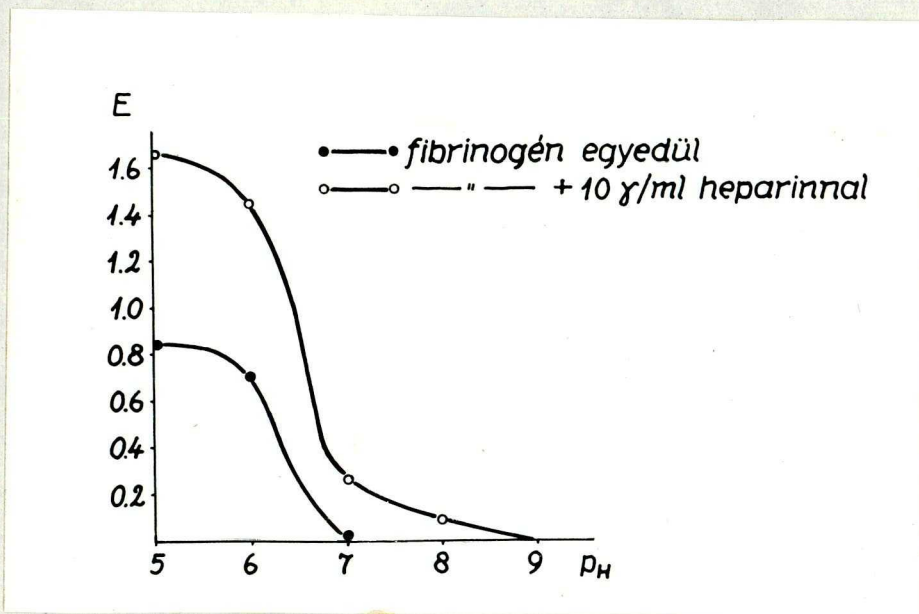
pH hatása

A protamin-fibrinogén komplex képződése az oldat pH-jának függvénye, így az azonos fibrinogén szinten /0,175 g% változó protamin koncentráció mellett az egyes pH értékeknél a komplex keletkezését leíró görbék /zavarosság mérés alapján/ lefutása is változó lesz /16. ábra/.

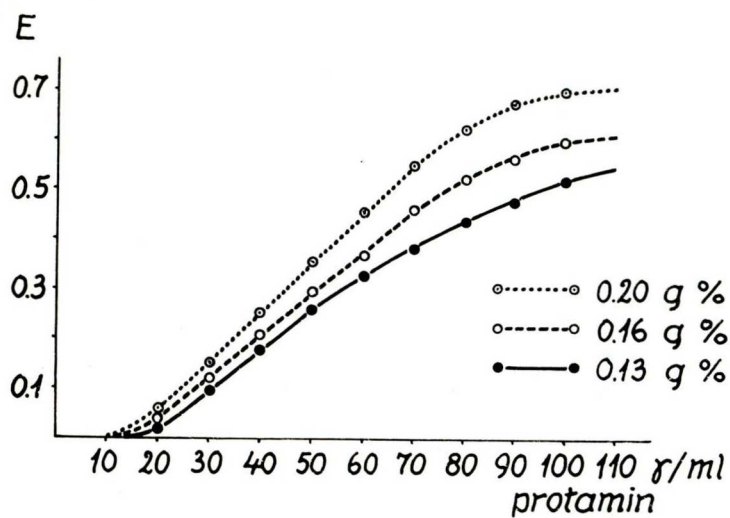
pH 5-6-nál a fibrinogén oldhatósága olyan kicsi,



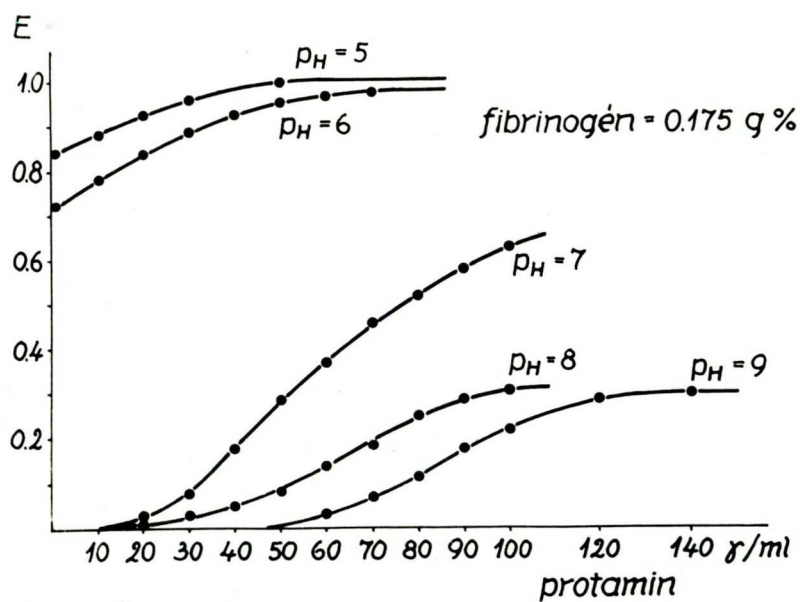
13. ábra



14. ábra



15. abra



16. abra

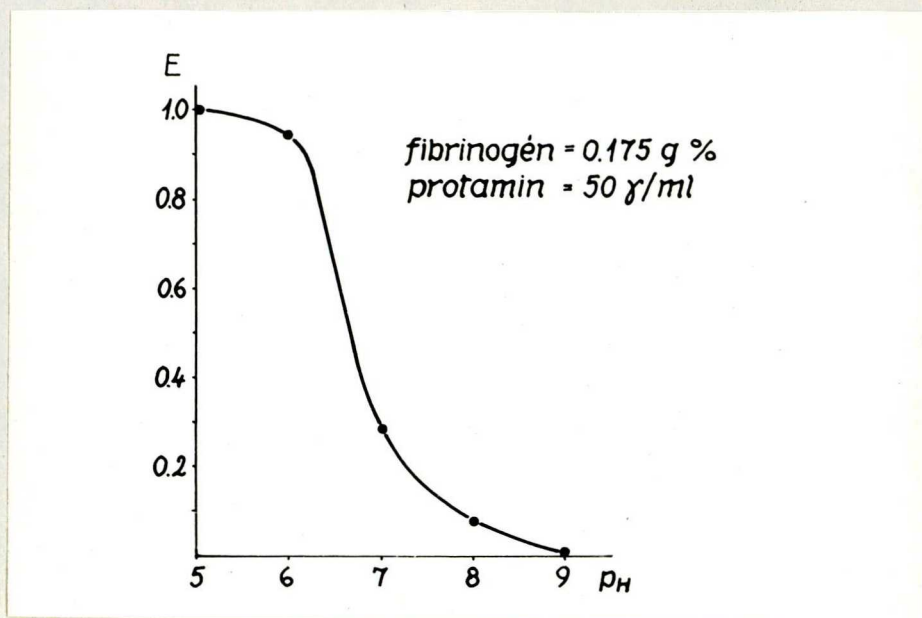
hogy már a phosphat puffer hígító hatására is kiválik az oldatból. Ez a kiválás olyan nagymértékű, hogy protaminnak a rendszerhez való hozzáadása csak kismértékű extinkció növekedést okoz. pH=7-nél és a lúgos tartományban a fibrinogént a phosphatpuffer oldatban tartja, a kicsapódás csak protamin hatására történik. pH 7-8-nál 10 δ /ml, pH=9-nél 50 δ /ml-nél nagyobb protamin koncentrációk okoznak csak zavarosodást. A pH lúgos tartományba való eltolása a görbék meredekségének csökkenését okozza. Azonos fibrinogén és protamin koncentráció mellett a fibrinogén-protamin komplex kicsaphatóságának mértékét a pH függvényében a 17. ábra szemlélteti.

A protamin és a heparin együttes hatásának vizsgálata

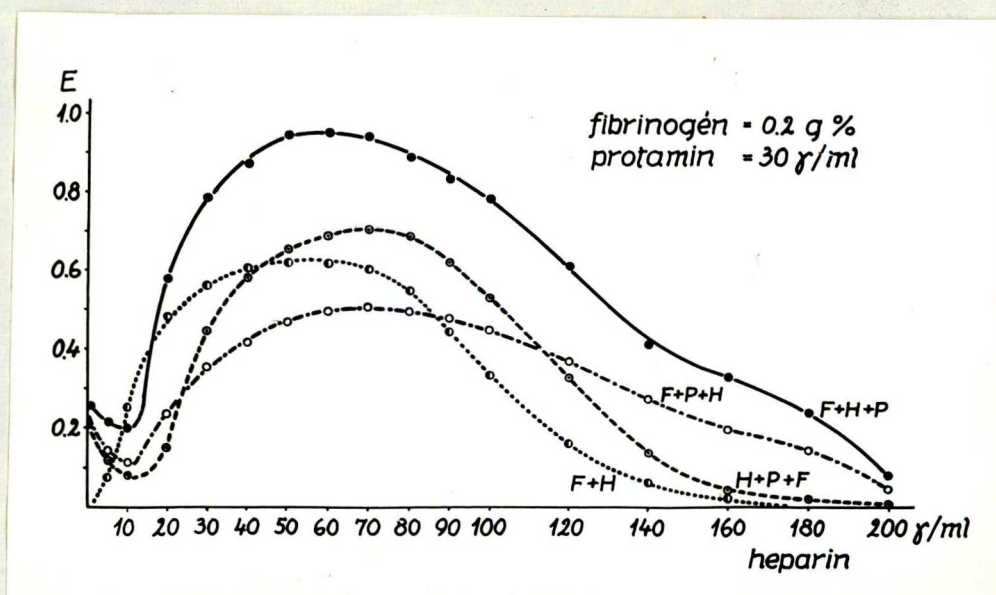
Ha fibrinogénhez pH=7-nél növekvő koncentrációban heparint adunk, úgy a fibrinogén heparinnal történő kicsaphatósága maximum görbével ábrázolható. A fibrinogén oldat koncentrációjától függő heparin értéknél a zavarosság maximális. Protamin hozzáadása a rendszerhez, a görbe alakját megváltoztatja: a maximum görbe helyett egy minimum-maximum görbét kapunk.

Azonos fibrinogén /0,16 g/ és protamin koncentráció mellett /30 δ /ml/ a heparin koncentrációját változtatva a görbék extrém értékei minden esetben azonos heparin koncentrációknál lépnek fel, extinkció értékük azonban a komponensek bemérési sorrendjétől függően változik. /18. ábra/.

A görbék minimumai minden esetben 10 δ /ml koncentrációnál lépnek fel, mivel az alkalmazott protamin ezen értéknél közömbösíti a heparin hatását. /1,5 mg protamin



17. ábra



18. ábra

1 mg heparint neutralizál/. Mivel a zavarosság mérése 2ml heparin és 1 ml protamin mennyiségekkel történt, ezért a görbén ábrázolt heparin értéket kétször szorozva kapjuk meg az oldat gamma heparin mennyiségét.

A görbék legmélyebb minimumát akkor kapjuk, ha a H+P keverékhez adunk fibrinogént, a legnagyobbat a komponensek F+H+P bemérési sorrendje adja. A görbék maximumai a fibrinogén-heparin görbéhez képest $50\gamma/\text{ml}$ a nagyobb koncentrációk felé eltolódva jelentkeznek $70\gamma/\text{ml}$. A maximum értéke a F+H+P bemérési sorrendnél a legnagyobb: a zavarosság extinkció értéke jóval felülmúlja a F+H görbét. A H+P+F sorrend maximuma még mindig nagyobb mint a H+P görbe, s csak a komponensek F+P+H bemérési sorrendje ad kisebb értéket ennél. A görbe extrém értékeinél, illetőleg azon heparin koncentrációnál, amelynél a zavarosság a minimális vagy maximális értéket éri el, az oldat heparin, fibrinogén, protamin molarányát a IX. táblázat tünteti fel.

	Mólarány	
	H : F : P	Heparin/ γ/ml
minimum	1 : 9,5 : 1,8	10
maximum	1 : 1,34 : 0,245	70
oldott kompl ex	1 : 0,475 : 0,09	200

Protamin = $30\gamma/\text{ml}$ fibrinogén = 0,2 g %

A protamin M = 13,800

A táblázat eredményei alapján látható, hogy a képződött hármas komplex akkor marad oldatlan, ha heparin feleslegéről gondoskodunk.

Állandó fibrinogén /0,16 g %/ és heparin szinten /30 δ /ml/ a protamin koncentrációját változtatva az egyes komponensek különböző bemérési sorrendje esetén - az előbbihez hasonló eredményhez jutottunk; azzal a különbséggel, hogy ez esetben maximum-minimum görbét kapunk /19.ábra/.

A maximumok 10 δ /ml, a minimumok 70 δ /ml, - minden esetben azonos protamin koncentrációknál lépnek fel. A maximumok^m extinkció értéke mind a három esetben nagyobb annál az extinkció értéknél, amelyet akkor kapunk, ha csak heparin van az oldatban. A legnagyobb minimum a F+H+P sorrendnél adódik, a másik két esetben azonos. A H+P+F sorrendű görbe minimuma nulla, a másik kettőé ennél nagyobb.

Kérdés, hogy a komponensek azonos bemérési sorrendje esetén azonos fibrinogén, változó protamin koncentráció mellett az oldat heparin koncentrációját is változtatva, ez utóbbi milyen mértékben változtatja meg a kicsapási görbék lefutását. A kísérletben a reakció komponensek bemérési sorrendje: H+P+F. A várakozásnak megfelelően a minimumok és maximumok helyei a nagyobb protamin koncentráció felé tolódnak el, a heparin koncentráció növekedésével, valamint ezek extinkció értékei is különbözőek /20.ábra/.

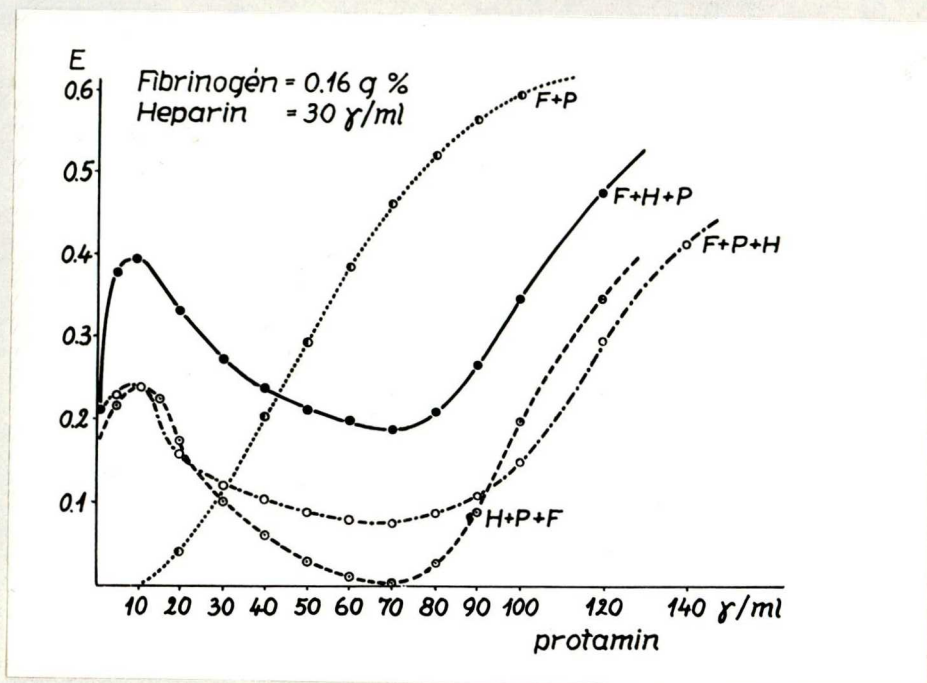
A zavarosság extrém értékeinél az oldatban fennálló molarányokat a X. táblázat ábrázolja.

/Fibrinogén: 0,145 g %/

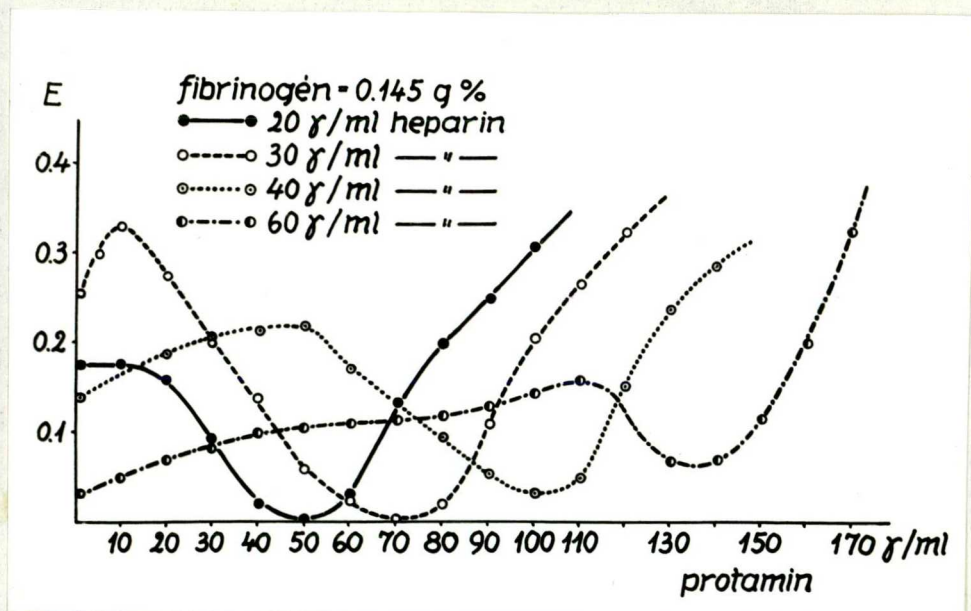
Heparin γ /ml	Maximum		Minimum	
	prot. γ /ml	H : F : P	prot. γ /ml	H : F : P
	1			
20	10	1 : 3,55 : 0,3	50	1 : 3,55 : 1,5
30	10	1 : 2,3 : 0,2	70	1 : 2,3 : 1,4
40	50	1 : 1,72 : 0,75	100	1 : 1,72 : 1,49
60	115	1 : 1,16 : 1,11	135	1 : 1,16 : 1,38

X. táblázat

Azonos fibrinogén koncentráció mellett az egyes heparin értékeknél felvett görbéken belül a H:F arány állandó; a protamin arány változik, s változásától függően kapjuk a minimum és maximum értékeket. A minimumokban a protamin a heparinhoz viszonyított mólaránya nagyobb mint a maximumokban. A heparin koncentrációjának növelésével a H:F arány csökken, a H:F arány a maximumokban nő, a minimumokban állandó. A maximumok extinkció értéke először nő a heparin mennyiségének növelésével, kb. azon heparin értékig, amelynél egyébként a fibrinogén-heparin görbe maximuma van, ezután csökken. Ha a maximumok extinkció értékeinek változását csak növekedés és csökkenés szempontjából vesszük figyelembe, az látszik, hogy analóg változik a heparin fibrinogén kicsapási görbévek, csak más extinkció értékkel. A minimumok a heparin koncentráció növelésével szintén a magasabb protamin tartomány felé tolódnak el.



19. ábra



20. ábra

Az oldat fibrinogén koncentrációjának a rendszerre gyakorolt hatását a 21. ábra tünteti fel azonos heparin $/30 \delta / \text{ml}$ a komponensek azonos bemérési sorrendje esetén $/H+P+F/$ változó protamin szint mellett. A fibrinogén koncentráció változása a minimumok és maximumok helyét nem változtatja meg, az alkalmazott heparin koncentráció mellett $/30 \delta / \text{ml}$ a maximumok $10 \delta / \text{ml}$, a minimumok $70 \delta / \text{ml}$ protamin koncentrációnál lépnek fel. A minimumok extinkció értéke nő, a maximumok szintén növekednek a fibrinogén koncentráció növelésével.

Megbeszélés

pH 7-nél a fibrinogén és a heparin reakciója révén egy könnyen disszociáló sószerű kötést tartalmazó komplex jön létre. A fibrinogén savas protein. Izoelektromos pontja 5,4.

pH 7-nél az izoelektromos pont lugos tartományában a fibrinogén az erősen pozitív töltésű csoportjai /feltehetően arginin és lysin/ a heparin negatív töltésű szulfocsoportjaival reagálni képesek oly mértékben, hogy csapadék keletkezzék, jellelhet a savas csoportok ennél a pH-nál negatív töltésűek.

Astrup és Piper /77/ a fibrinogénnek különböző polysaccharida kénsavakkal alkotott sóinak vizsgálatánál szintén arra a megállapításra jutott, hogy az utóbbiak a fibrinogénnel az izoelektromospont alkalikus oldalán is reagálnak.

A fibrinogén és a heparin közötti reakció stöchiometrikus /Gödal /68/. A reakció mértéke az oldat heparin

és fibrinogén koncentrációjától függ. A fibrinogén heparinra történő kicsaphatósága maximum görbével ábrázolható. A zavarosság maximuma a fibrinogén koncentrációtól függő heparin értéknél van. A fibrinogén koncentráció növelésével a maximális kicsapáshoz szükséges heparin mennyiség nő, azaz a nagyobb fibrinogén koncentrációju oldatban a komplex oldatból való kiválásához relative több heparinra van szükség. Ha a fibrinogénhez képest a heparin feleslegét biztosítjuk az oldatban, azaz 1 mól heparinra kisebb mint 1 mól fibrinogén jut, a komplex oldott állapotban lesz. Ez a tény azzal magyarázható, hogy a heparin a fibrinogénhez kötődve megváltoztatja annak izoelektromos pontját. A molekula negative töltődik fel, tehát az izoelektromos pontot a savanyubb pH felé tolja el. Alacsony heparin koncentrációk jelenléte először a komplex oldékonyságát csökkentve annak oldatból való kiválását elősegítik. Ha a heparin a maximális kicsapáshoz szükséges mennyiségeknél nagyobb koncentrációban van jelen, a molekulát fokozatosan negative tölti fel, s a komplex oldatban maradását elősegíti.

A pH savas tartomány, tehát az izoelektromos pont felé való eltolása a fibrinogén oldatból való kiválását elősegíti: elektrolyt hatáson alapul. Mint minden amphoter elektrolyt, úgy a fibrinogén is az izoelektromos pontjában és közelében a legkevésbé stabilis. pH 5-6-nál a fibrinogén már a puffer hígító hatásának következtében kiválik az oldatból. Heparin jelenléte ezt az alapsavasságot megnöveli.

A pH lúgos tartomány felé való eltolása mind a fibrinogénre, mind a fibrinogén-heparin komplexre oldódólag hat. A fibrinogén-heparin komplex pH=9-nél már oldott állapotban van jelen.

A fibrinogén mint savas protein polyaminokkal, bázisos polypeptidekkel kevésbé disszociáló sókat alkot. Protamin hatására a fibrinogén oldatban erős zavarosodás lép fel. A protamin bázisos aminoscsoportjai a fibrinogén carboxylcsoportjaival sókötést létesítenek. A carboxylcsoportoknak ilyen módon történő blokkírozása a fibrinogén oldhatóságát csökkenti, s az oldatból való kiválását okozza. 10 γ /ml protamin még nem hoz létre zavarosodást az oldatban, nem elégséges a fibrinogénprotamin komplex oldatból való kiválásához. 100 γ /ml protamin koncentráció felett, a protamin az oldhatóságot oly nagy mértékben csökkenti, hogy a komplex csapadék alakjában kiválik az oldatból, turbidimetriásan nem értékelhető eredményeket kapunk.

A pH a fibrinogén-protamin komplex oldatból való kiválását, tehát a zavarosság mértékét megváltoztatja. Mint már említettük, az izoelektromos pont közelében pH 5-6-nál a fibrinogén már a puffer hígító hatása következtében is kiválik az oldatból. Az izoelektromos ponton és közelében a molekula részben disszociálatlan alakban, részben egyenlő számú pozitív és negatív töltést tartalmazó u.n. felemás ion alakjában van jelen, tehát a fibrinogén és protamin között a reakció csak kismértékben játszódik le, protamin hatására a görbék csak kismértékű emelkedést mutatnak. pH=7-nél a legmeredekebb lefutású a görbe. pH 8-9-nél a görbék

mak ellaposodnak, ami azt jelentené, hogy a komplex képzés kisebb. Magyarázatként az a feltevés fogadható el, hogy a lúgos oldat, amely a fibrinogént oldatban tartja a képződött komplex oldatból való kiválását is megakadályozza /elektrolýthatás/.

Ha egy fibrinogén oldathoz heparint és protamint adunk, a képződő komplex oldatból való kiválásának mértéke egyrészt a komponensek koncentrációjától, másrészt azonos kísérleti feltételek mellett ezek bemérési sorrendjétől függ. Kérdés, hogyha egy rendszerben fibrinogén, heparin és protamin egyszerre van jelen, milyen kötődések jönnek létre az egyes reakció komponensek között. A fibrinogén bázisos aminocsoportjai a heparinnal, carboxylcsoportjai pedig a protaminnal létesítenek sókötést. Egy másik lehetőség a heparin savas csoportjainak protaminnal való neutralizációja. Attól függően, hogy az egyes reakció komponenseket milyen sorrendben adjuk egymáshoz, az egyik reakció előtérbe kerül, a másik ugyanakkor visszaszorul, vagy fordítva. Ettől függően kapjuk a minimum-maximum görbékben az extrém értékek különbségét.

Ha a heparin koncentráció változása mellett a fibrinogén és a protamin koncentrációja állandó, a komplex oldatból való kiválása minimum-maximum görbével ábrázolható. A minimumnak és maximumnak extinkció értéke a komponensek bemérési sorrendjétől függően változik, viszont az extrém értékek minden esetben azonos heparin koncentrációnál lépnek fel az alkalmazott koncentráció viszonyoktól függően.

A minimumok annál a heparin koncentrációnál jelentkeznek, ahol a protamin a heparin hatását éppen neutralizálja. A legkisebb minimumot a reakciókomponensek H+P+F bemérési sorrendje adja, ebben az esetben a fibrinogén-heparin, a fibrinogén-protamin reakció nem ^{hat} gátlólag a heparin és a protamin között lejátszódó neutralizáció folyamatára. A legnagyobb minimum a F+H+P bemérési sorrendnél lép fel. A heparin egy része előzetesen már a fibrinogénhez kötődik, így a protamin neutralizáló hatása kevésbé érvényesül. Hasonló eset áll fenn a F+P+H sorrendnél.

A maximumok a fibrinogén-heparin görbéhez képest /50 δ /ml/ a nagyobb heparin koncentrációk felé tolódnak el /70 δ /ml/, azaz protamin jelenlétében a maximumok eléréséhez relative több heparinra van szükség. Ugyanez vonatkozik a komplex oldódására is. A maximum extinkció értéke a F+H+P esetén a legnagyobb. Mint már említettem, ha a heparint növekvő koncentrációban adjuk a fibrinogénhez, úgy a heparin az egész molekulát negative tölti fel a szabad SO_3H csoportok révén és a fibrinogén-heparin komplex izoelektromos pontját a savas tartomány felé tolja el. Ha ezután protamint adunk a rendszerhez, a reakció sokkal nagyobb mértékű lesz, mint amikor a protamin, vagy a heparin külön-külön reagál a fibrinogénnel. Heparin feleslege a fentebb leírtak alapján a komplex oldódását segíti elő. A folyamat reverzibilis. Protamin adására, ha a heparin nincs nagy feleslegben a zavarosság ismét visszaáll. A H+P+F sorrend az előbbinél kisebb maximumot ad, de extinkció

értékben még mindig nagyobb, mint a fibrinogén - heparin görbe maximuma. A legkisebb maximumot a reakció komponensek F+P+H bemérési sorrendje adja. A protamin a fibrinogénhez kötődve azt viszonylag pozitíve tölti fel, s gátolja a heparin fibrinogénnel való reakcióját.

Állandó fibrinogén és heparin koncentráció alkalmazása mellett a protamin koncentrációját változtatva az előbbihez hasonló eredményhez jutunk, azzal a különbséggel, hogy a zavarosság mértéke maximum-minimum görbével írható le. A maximumok annál a protamin értéknél jelentkeznek /10 γ /ml/, amelynél - ha heparin nincs jelen az oldatban - a protamin a fibrinogénnel még nem képez oldhatatlan komplexet. Tehát a heparin a protaminnal szemben feleslegben van jelen: a H:P molarány 1:0,2. A maximumok keletkezése a fentiekben közölt módon magyarázható. A minimumok mindhárom esetben 70 γ /ml protamin koncentrációnál lépnek fel az adott reakció körülmények között. A minimumok keletkezésére illetőleg azok extinció értékben való különbözőségére az előzőleg már közölt magyarázat érvényes. A minimumban a molarány H:P = 1 : 1,38. Protamin feleslege, azaz ha a molarányban a protamin 1,38-nál nagyobb, a komplex oldatból való kiválását eredményezi.

A minimumok és maximumok helyei egy adott fibrinogén koncentráció mellett az oldat heparin és protamin koncentrációjától függenek. Ezt bizonyítja az a kísérlet, amelyben állandó fibrinogén szinten a komponensek azonos bemérési sorrendje mellett /H+P+F/ a protamin és a heparin koncentrációját is változtatva, a görbék extrém értékei az utóbbi

koncentrációját növelve a nagyobb protamin koncentrációk felé tolódnak el.

A minimumok és maximumok extinkció értéke pedig az oldat fibrinogén koncentrációjától függ. Ha állandó heparin szinten a protamin és a fibrinogén koncentrációját változtatjuk, a komponensek azonos bemérési sorrendje mellett /H+P+F/ úgy a minimumok és maximumok helyei nem változnak, extinkció értékük azonban nő a fibrinogén koncentráció növelésével.

Alacsony fibrinogén koncentrációknál a minimumok extinkció értéke nulla, ez utóbbi koncentrációját növelve az extinkció nő. Ez a tény azzal magyarázható hogy a heparin és a protamin neutralizációja révén keletkező komplex disszociálabilis, ennek következtében az oldatban mindig van jelen szabad heparin és protamin, amelyek a fibrinogént oldatából kicsapják. Alacsony fibrinogén koncentrációk azonban nem elégségesek a komplex képzéshez. Ha az oldatban a fibrinogén-heparin molarány 2,26-nál nagyobb, úgy a minimumban zavarosság lép fel, amely a fibrinogén koncentráció növelésével nő.

III. Heparin és protamin hatása a thymol turbiditási reakcióra

Fischer /61/ észlelte először, hogy a szérumglobulinoknak a desztillált vízzel való hígítás folyamán fellépő oldatból való kiválását a heparin jelenléte megakadályozza. A heparin hatásának kvantitatív vizsgálatára a kísérleteket pH = 5,5-nél végezték. Nagyobb mennyiségű heparin meggátolja a fehérjék oldatból való kiválását, vagy a már kicsapódott fehérjét oldatba viszi. A heparin hatása abban áll, hogy a globulin molekulákra kötődve azokat negative tölti fel, és ezáltal a fehérjék izoelektromos pontját a savas tartomány felé eltolva megakadályozza azok oldatból való kiválását.

Mivel a thymolturbiditási próba a szérumban kórosan felfszaporodott globulinoknak kimutatására használt módszer, ezért feltehető, hogy a heparin a globulinokra gyakorolt hatása révén a thymolturbiditás mértékét is megváltoztatja. A klinikai laboratóriumi diagnosztikában a thymolturbiditási próba általánosan használt módszer, a kórosan felfszaporodott globulinok kimutatására, így a heparinnak és a protaminnak a thymolturbiditásra gyakorolt hatása nemcsak elvi, hanem gyakorlati jelentőségű is.

Az alábbiakban ismertetett kísérletben a heparin, valamint a heparin antagonistájának, a protaminszulfátnak a thymolturbiditási reakcióra kifejtett hatásával foglalkozom.

Reagensek:

1/ Thymololdat:

500 ml desztillált vízben 1,38 g veronálnátriumot és 3 g thymolt oldunk. Az oldás elősegítésére forrásig melegítjük, miközben többször felrázunk, majd lehűtjük az oldatot. A folyadék felületére néhány darab thymolkristályt szórunk, és újból felrázunk. Egy éjjelen át állni hagyjuk és ismételt felrázás után szűrjük. Az oldat pH=7,6 legyen /Bálint és Hegedüs /78//.

2/ Különböző pH-ju thymolpuffer:

1,03 g veronálnátriumot 500 ml desztillált vízben feloldunk. Az így elkészített oldat, valamint 0,01 n HCl megfelelő arányu keverésével a kívánt pH-ju oldatot előállítjuk. Ezen puffer 250 ml-éhez 1,5 g thymolt adunk. A továbbiakban a fentebb leírt módon, járunk el. /Forralás, hűtés stb./ Bár a thymol az oldatok pH-ját nem változtatja meg lényegesen, mégis célszerű a pH-t ismételten ellenőrizni.

3/ Heparin:

6 %-os heparin oldatból /Kőbányai Gyógyszergyár, Budapest/ 100 mg/ml heparin törzsoldatot készítünk. A kívánt koncentrációju heparin oldatokat a törzsoldat desztillált vízzel való hígításával állítjuk elő.

4/ Protaminszulfát: /Hoffmann la-Roche, Basel/

5 mg/ml törzsoldatot készítünk, és a kívánt koncentrációju oldatokat a törzsoldat hígításával állítjuk elő.

Módszer

6 ml thymololdathoz 0,1 ml szérumot mérünk és a zavarosságot 30 perc állás után S₅₇-es színszűrőn 1 cm-es küvettában vakpróbával szemben Stufófotométeren mérjük.

Vakpróba: 6 ml 0,9 %-os NaCl-hoz 0,1 ml szérumot adunk.

Eredmények

A heparin hatása

A szérumban kórosan felszaporodott globulinok a thymolt kolloid oldatából kicsapják. A heparin koncentrációjától függő mértékben a kolloidok oldatból való kiválását megakadályozza, vagy a már kivált kolloidot oldatba viszi. Hatásának pontos megismerésére a következő vizsgálatokat végeztem el:

1/ Thymololdathoz először heparint adtam majd /0, 15, 30, 45, 60 perc/ állás után szérumot adtam a mintához és 30 perc állás után a zavarosságot mértem. A vizsgálatot minden esetben 0,1 ml szérummal, 6 ml thymololdattal és 0,1 ml heparin térfogat mennyiségekkel végeztem. A vakpróba-hoz 0,1 ml fiziológiás sóval többet mértem, a heparinnak a próbákhoz való hozzáadása következtében beálló térfogatváltozások kiküszöbölésére.

2/ Szérumot heparinnal különböző ideig /0, 15, 30, 45, 60 perc/ állni hagytam, majd a thymololdat hozzáadása után a thymolreakció lejátszódásához szükséges 30 percre állni hagytam.

Két különböző koncentrációju heparinoldattal elvégezve a vizsgálatot az eredményeket a XI. táblázat tünteti fel.

Állási idő perc	Extinkció			
	1		2	
	1 mg/ml	2 mg/ml	1 mg/ml	2 mg/ml
0	0,46	0,375	0,275	0,19
15	0,44	0,36	0,26	0,18
30	0,43	0,36	0,255	0,165
45	0,425	0,35	0,25	0,165
60	0,41	0,335	0,25	0,16

XI. táblázat

Thymolturbiditás: 0,60 /Heparin nélkül/

A vizsgálatok eredményeiből látható, hogy a heparin turbiditás csökkentő hatása akkor a legnagyobb, ha a heparinhoz először szérumot adunk /2.pont/. Ha a heparint thymololdattal hozzuk össze először és ezután adunk szérumot a mintákhoz, úgy a heparin zavarosság feltisztító hatása már kisebb /1.pont/. Ez a tény azt bizonyítja, hogy a heparin nem a thymolhoz, hanem a globulinokhoz kötődve fejti ki hatását. A heparinnal való állási idő növelésével a zavarosság mindkét esetben csökken.

A heparinnak a már kivált kolloidokra gyakorolt hatásának megismerésére a következő két vizsgálatot végeztem el:

1/ Thymololdathoz szérumot adtam és összerázás után azonnal heparint mértünk az oldathoz és 15,30,45, 60 perc állás után az extinkciót mértük.

2/ Thymolpufferhez szérumot adtam és 30 perc állás után, tehát amikor már a thymol és a globulinok közti reakció teljesen lejátszódott, heparint mértem az oldathoz

és 15, 30, 45, 60 perc állás után a keletkezett zavarosságot fotometrizáltam két különböző heparin koncentrációnál elvégezve a meghatározást. Az eredményeket a XII. táblázat tünteti fel.

Állási idő perc	Extinkció			
	1		2	
	1 mg/ml	2 mg/ml	1 mg/ml	2 mg/ml
0	0,40	0,355	0,52	0,425
15	0,42	0,36	0,50	0,41
30	0,43	0,363	0,48	0,40
45	0,43	0,37	0,46	0,395
60	0,44	0,385	0,45	0,39

XII. Táblázat

Thymol turbiditás: 0,60 /Heparin nélkül/

Abban az esetben, ha a thymol és szérum közötti kölcsönhatás következtében a kolloidok már kicsapódtak az oldatból /2.pont/, a heparin a kolloidokat oldatba viszi. A heparinnal való állási időt növelve a zavarosság csökken, azonban egy órai állás után sem éri el a feltisztulásnak azt a mértékét, amelyet akkor kapunk, ha a heparint rögtön a szérum bemérésée után az oldathoz adjuk.

A XI. és a XII. táblázat eredményeit összehasonlítva megfigyelhetjük /mindkét vizsgálat azonos szérummal történt/, hogy az extinkció értékek azonosak abban a két esetben, amikor a thymolpuffert heparinnal 30 percig állni hagyjuk és ezután adjuk hozzá a szérumot, és ismételt 30 perc állás után mérjük a zavarosságot, vagy ha a thymolhoz szérumot majd rögtön heparint adunk és 30 perc állás után a turbiditást mérjük.

Ezért a további vizsgálatokat oly módon végeztem, hogy 6 ml thymol pufferhez 0,1 ml heparint adtam. 30 perc állás után 0,1 ml szérumot, majd ismételt 30 perc állás után a zavarosságot vakpróbával szemben mértem.

Négy különböző szérummal, amelyek thymolturbiditási értéke, tehát globulin koncentrációja is különböző, elvégezve a meghatározást változó koncentrációjú heparinnal az eredményeket a XIII. táblázat tünteti fel.

	Extinkció			
Heparin mg/ml	I.	II.	III.	IV.
100	0,11	0,0	0,062	0,0
30	0,16	0,06	0,125	0,07
10	0,23	0,095	0,175	0,145
5	0,275	0,125	0,23	0,23
2,5	0,385	0,15	0,28	0,25
1	0,42	0,18	0,325	0,33
0,5	0,47	0,21	0,38	0,365
0,1	0,55	0,236	0,43	0,43
0,01	0,565	0,247	0,50	0,47
0,00	0,57	0,249	0,50	0,473

XIII. táblázat

Minél nagyobb a szérum globulinjai által okozott turbiditás nagysága, annál magasabb a koncentrációban kell jelen lennie a heparinnak, hogy a zavarosság teljes feltisztulását okozza. A turbiditás nagysága, valamint a zavarosság teljes feltisztulásához szükséges heparin mennyiség között

számszerű összefüggés nem vonható le. Viszonylag alacsony heparin koncentrációk a zavarosság kismértékű csökkenését eredményezik.

Protamin hatása

A protaminnak a thymolturbiditásra gyakorolt hatása a heparinéval ellentétes: koncentrációjától függően a zavarosságot növeli.

Protamin hatására a thymololdatban zavarosság nem keletkezik. A globulinoknak a thymol kolloidokra kifejtett kicsapó hatását minden esetben megnöveli, de az adott reakció körülmények között különböző mértékben. A XIV. táblázatban feltüntetett extinkciók szemléltetik négy különböző módon elvégzett vizsgálat kísérleti eredményeit.

1/ Protamint thymolpufferrel különböző ideig /o, 15, 30, 45, 60 perc/ állni hagytam. Szérum hozzáadása és 30 perc állás után a zavarosságot mértem.

2/ Szérumot protaminnal a fent említett ideig állni hagytam. Thymololdat hozzáadása után 30 percig állni hagytam és a zavarosságot fotometrizáltam.

3/ A thymololdathoz először szérumot, majd az összekeverés után rögtön protamint adtam, s különböző ideig tartó állás után fotometrizáltam.

4/ Thymololdathoz szérumot, majd 30 perc állás után - tehát a thymol reakció lejátszódásához szükséges idő után - protamint mértem az oldathoz, s különböző ideig való állás után a zavarosságot mértem. A meghatározás minden esetben 0,1 ml szérum, 0,1 ml 1 mg/ml koncentrációjú protamin, és 6 ml thymol mennyiségekkel történt.

Idő	Extinkció			
	1	2	3	4
0	0,83	0,83	0,235	-
15	0,77	0,80	0,68	0,44
30	0,74	0,71	0,742	0,57
45	0,742	0,71	0,74	0,56
60	0,74	0,713	0,743	0,565

XIV. táblázat

Thymolturbiditás: 0,40

Protamin : 1 mg/ml

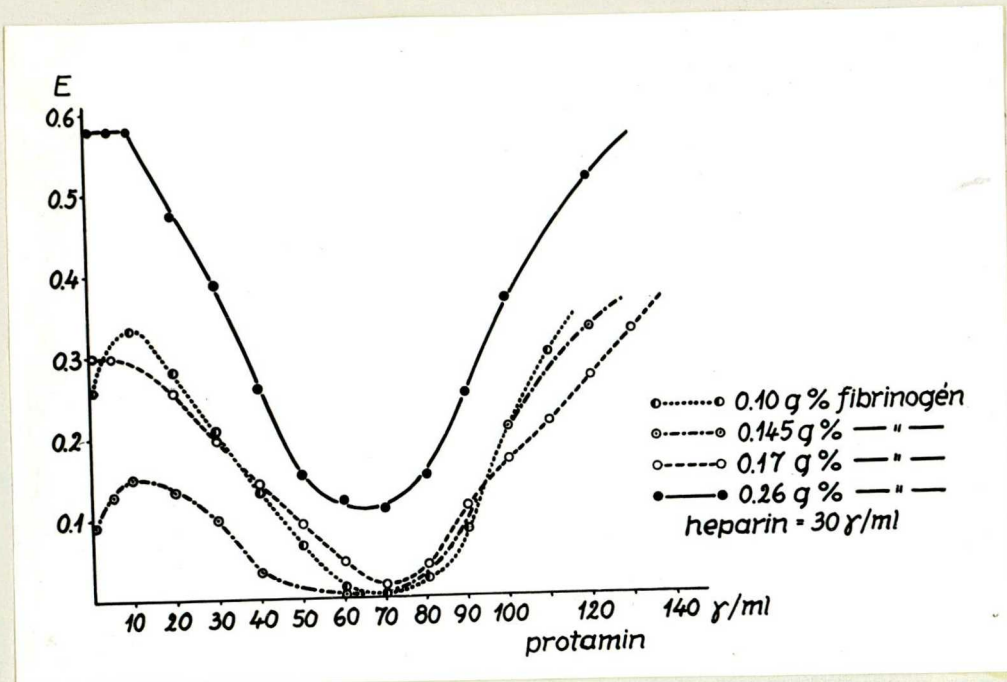
A protaminnak a rendszerre gyakorolt hatása akkor a legmegkisebb, ha a thymolreakció a globulinokkal már lejátszódott /4.pont/. 30 perc állás után az extinkciók mind a négy esetben állandóak, az állási idő további meghosszabbításával a zavarosság mértéke nem változik.

Az 1. és a 3. pont alatt leírt módon elvégezve a vizsgálatokat 30 perc állás után mért extinkciók azonosak, ezért a további vizsgálatokat az 1. pont alatt leírt módon végeztük el, változó protamin szint mellett.

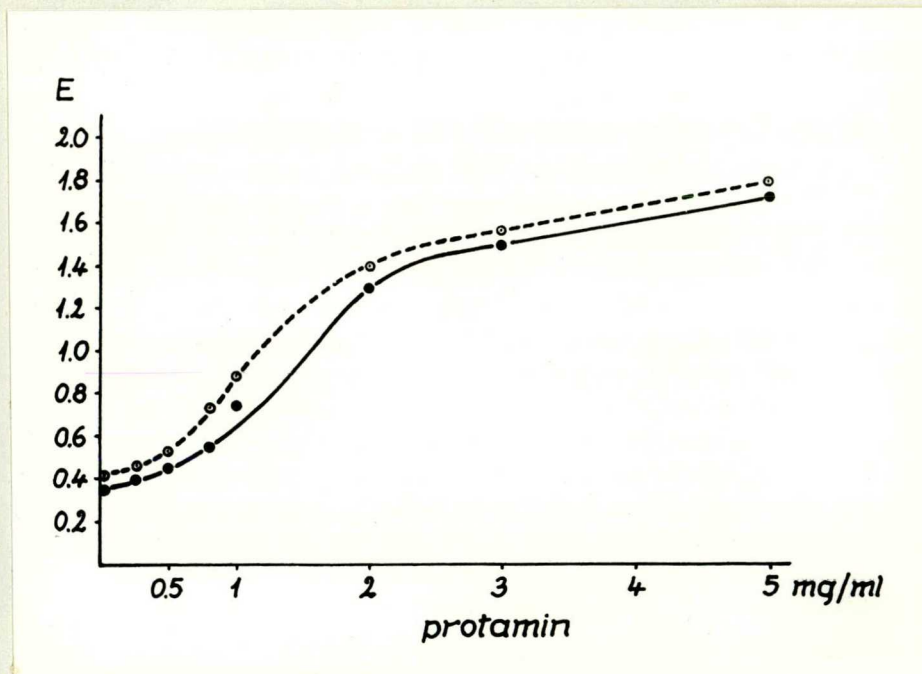
Két különböző szérum mintából kapott eredményeket tüntettem fel a 22. ábrán. Alacsony protamin koncentrációk /100 /ml alatt/ nem hoznak létre változást a turbiditásban. Ennél magasabb koncentrációk a zavarosságot növelik.

A heparin és a protamin együttes hatása

A heparin és a protamin a globulinok okozta thymolturbiditásra kifejtett hatásukat tekintve ellentétesek:



21. ábra



22. ábra

a heparin a zavarosságot feltisztítja, a protamin növeli.
Kérdés, hogyha mindkettő egyszerre jelen van, milyen mértékben változtatják meg a kolloidok oldatból való kicsapódásának mértékét.

A meghatározást a fentiekben leírt módon végeztem el: 6 ml thymolpuffer + 0,1 ml heparin. Összekeverés után 0,1 ml protamint, 30 perc állás után 0,1 ml szérumot mérünk az oldathoz. Ismételtén 30 perc állás után vakpróbával szemben a zavarosodást mérjük. A vakpróbához 0,2 ml fiziológiás sóval többet mérünk, a heparin és a protamin hozzáadása miatt fellépő térfogat növekedés kiküszöbölésére.

Különböző heparin koncentráció mellett változó protamin mennyiségekkel elvégezve a kísérletet az eredményeket a XV. táblázat tünteti fel.

Heparin mg/ml	Extinkció				
	P = 0	P = 0,25mg/ml	P=0,5 mg/ml	P=1mg/ml	P=2mg/ml
30	0	0	0,03	0,07	0,085
20	0,01	0,015	0,04	0,08	0,135
10	0,06	0,065	0,07	0,095	0,16
5	0,095	0,10	0,11	0,12	0,21
2,5	0,135	0,14	0,145	0,15	0,285
1,0	0,19	0,20	0,21	0,22	0,60
0,5	0,255	0,26	0,28	0,30	0,81
0,2	0,305	0,315	0,35	0,50	1,05
0,1	0,34	0,36	0,395	0,60	1,2
0,05	0,36	0,375	0,40	0,66	1,3
0,025	0,365	0,385	0,405	0,68	1,305
0,00	0,37	0,39	0,41	0,685	1,330

A rendszerben mind a heparin mind a protamin hatása egymás mellett érvényesül. A protamin a zavarosságot növeli, a heparin csökkenti. Ha azonos protamin koncentráció mellett növekvő mennyiségben heparint adunk az oldathoz, ez utóbbi a protamin által megnövelt zavarosságot a koncentrációjától függően feltisztítja. Minél nagyobb koncentrációban van jelen a protamin, annál nagyobb a kolloidok kicsapódása azonos koncentrációju heparin alkalmazása mellett, más szóval annál több heparinra van szükség, hogy a kolloidok oldatból való kiválását megakadályozzuk.

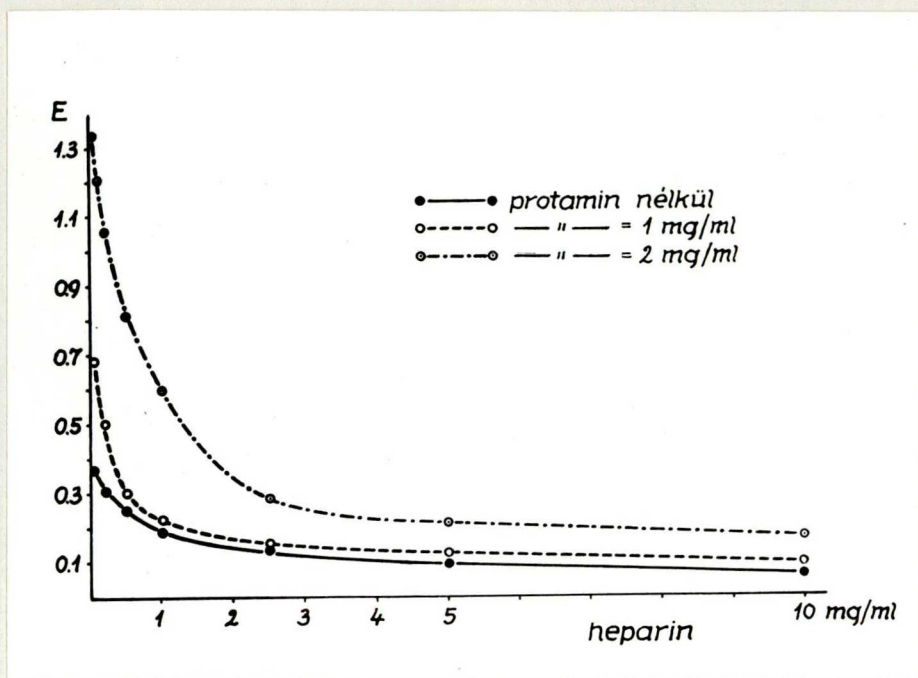
A heparin hatását leíró görbék alakját a protamin jelenléte nem változtatja meg, csak a görbék a magasabb extinkció tartományban futnak /23. ábra/.

Megbeszélés

MacLagan /79/ a vérben kérosan felszaporodott globulinok meghatározására az általa kidolgozott thymolturbiditási próbát ajánlotta, amely a közhasználatban rendkívül elterjedt.

Saifer /80/ szerint a thymolturbiditás létrejötte a fehérjék azon tulajdonságának köszönhető, hogy mint poláros csoportokat tartalmazó molekulák olyan organikus vegyületekkel amelyek phenolos karakterrel bírnak, mint a thymol is, vagy savas vagy bázisos csoportokat tartalmaznak zavarosság keletkezik. A globulinok a thymol oldat kolloid stabilitását csökkentve azok oldatból való kiválását eredményezik. A folyamat közelebbi, pontos mechanizmusa azonban nem ismeretes.

A heparin a kolloidok oldatból való kiválását



23. ábra

megakadályozza, vagy a már kivált kolloidokat oldatba viszi: tehát a zavarosság feltisztulását okozza. Ezen hatását nem a thymol, hanem a fehérjékkel való reakciója révén fejti ki.

Ez utóbbit bizonyítja egyrészt az a tény, hogy heparint adva a thymolpufferhez, zavarosság nem keletkezik, másrészt bizonyítja az a kísérleti eredmény is, amely szerint a heparin sokkal nagyobb mértékben gátolja a turbiditás létrejöttét, ha szérummal inkubáljuk, mint abban az esetben, ha thymololdattal hagyjuk állni. Tehát a heparin nem a thymolhoz, hanem a fehérjékhez való kapcsolódás révén fejti ki hatását. A heparin a globulinokhoz kötődve a fehérje molekulák felületi negatív töltését növeli. Itt fel kell tételezni, hogy a thymol, mint phenolos karakterű molekula pH 7,6-os veronapufferben kismértékben savasan disszociál, így a kolloidok felületi negatív töltéssel rendelkeznek, s mint ilyenek, az ugyancsak negative feltöltött globulin molekulákra taszítólag hatnak. Alacsony heparin koncentrációk a zavarosságot csak kismértékben csökkentik: a fehérje molekulák felületi áttöltődése még nem elégséges ahhoz, hogy megakadályozza a globulinoknak a kolloidokra kifejtett kicsapó hatását. A zon heparin koncentrációk, amelyeknél zavarosság nem lép fel, a fehérje molekulák felületi áttöltése megtörtént, s a részecskék között fellépő taszító erők elégségesek a thymol és a globulinok közötti reakció megakadályozására.

Tehát a thymolturbiditás nagysága a felületi negatív töltés nagyságából, ez utóbbi pedig az oldat heparin koncentrációjától függ.

Ezen kísérleti adatokból a módszer használhatóságára az a gyakorlati tény vonható le, hogy heparinnal mint alvadésgátlóval levett plazmából, vagy előzetesen heparint kapott egyén véréből elvégzett vizsgálat hamis eredményt szolgáltatathat: a valódi értéknél kisebbet. Ez utóbbi a plazma heparin koncentrációjától függ.

A protamin a heparinnal ellentétben a turbiditás mértékét növeli, bázisos aminos csoportjai a globulinok carboxylcsoportjaival lépnek reakcióba, ezáltal a felületi negatív töltéseket csökkentve, elősegíti a thymol és a globulinok közötti reakciót.

Ha a heparin és a protamin együtt vannak jelen a rendszerben, úgy mindkettő külön-külön fejti ki hatását a rendszerre, hiszen a fehérje molekulák nem azonos csoportjaira hatnak. A heparin a thymolturbiditás mértékét csökkenti, a protamin növeli, a zavarosság nagysága a koncentráció arányoktól függ. A thymolturbiditási próba tehát nem alkalmazható olyan esetekben sem, amikor a beteg heparint és ezt követően protamint kapott. Mivel általában 1 mg heparin neutralizálására 1,5 mg protamint szoktak adagolni, úgy ebben az esetben feltehetően a várt eredménynél nagyobb értéket fogunk kapni.

Összefoglalás

A heparin és a fehérjék között lejátszódó folyamatok quantitativ vizsgálatára egy kémiai elven alapuló heparin meghatározást dolgoztam ki. A sósavas hidrolízis folyamán glucose egységekre bontott heparin diphenylaminnal színreakciót hoz létre. A színintenzitás és a koncentráció közötti összefüggés arányosságból következik, hogy a Beer-Lambert törvényt követi. Ezen módszer alkalmazásával a fehérjékhez nem kötődő u.n. szabad heparin koncentrációja határozható meg.

A heparinnak a szérumfehérjékhez, mint egységesanyaghoz való kötődését vizsgáltam. A szabad heparin meghatározása alapján kapott eredményeket a következőkben foglaltam össze:

1/ A szabad, illetve a kötött heparin mennyisége azonos fehérje koncentráció mellett egyrészt a heparin koncentrációtól, másrészt az oldat pH-jától függ. Két különböző pH-t biztosító fehérje lecsapószer alkalmazása azt bizonyítja, hogy erősen savanyu oldatban pH 1-2-nél /trichloreccetsavas kicsapás/ a szabad heparin koncentrációja nagyobb, a kötött hepariné kisebb, mint pH 6-7-nél /ZnSO₄ + NaOH-os fehérjementesítés/.

Az oldat heparin koncentrációjának növelésével a szabad heparin mennyisége mindkét esetben nő. A kötött heparin mennyisége a trichloreccetsavas kicsapásnál egy adott heparin koncentrációig emelkedik, ezután nem változik, a ZnSO₄ + NaOH-os fehérjementesítésnél pedig nő. A szabad heparin mennyisége a beadott heparin %-ában kifejezve mindkét esetben nő, a kötött

heparin esetén csökken. A disszociációs konstans értéke erősen savas pH-nál /trichlorecetsavas fehérjementesítés-nél/ a heparin koncentráció növelésével emelkedik, azaz a keletkező fehérje-heparin komplex stabilitása csökken. A ZnSO_4 + NaOH-os kicsapás esetén állandó.

2/ A heparin a vérben gyakorlatilag a plazmában, illetőleg a szérumfrakcióban helyezkedik el. A vörösvértestek nem kötnek meg heparint. A heparin terápia alkalmazásakor a szabad heparin megjelenéséhez szükséges mennyiségnek csak kb. 1/50-ed részét juttatják a szervezetbe. Ez biológiai értelemben azt jelenti, hogy az in vivo szervezetbe juttatott heparin teljes mértékben fehérjéhez kötött állapotú.

A heparin hatására a fehérjék elektroforetikus képében beálló változások az alábbiakban foglalhatók össze:

1/ A fehérje-heparin komplex mint új komponens a fehérjétől elkülönülve jelenik meg. Mobilitása nagyobb mint az albumin vándorlási sebessége, de a leírt kísérleti feltételek mellett azonos a heparin mobilitásával.

2/ A pH változásával a keletkező komplex mobilitásában nem mutatható ki változás, míg a komplex összetétele pH-tól függ. A pH növelésével az új komponens fehérje tartalma pH-7-ig nő, ezután csökken.

A heparinnak és a protaminnak a fibrinogénre gyakorolt hatásának vizsgálatából kapott eredményeket a következőkben foglalom össze:

1/ A heparin-fibrinogén által okozott turbiditás maximum görbével ábrázolható. A fibrinogén koncentráció

növelésével a maximális kicsapáshoz és a komplex oldódáshoz szükséges heparin mennyisége nő. A pH savas tartomány felé való eltolása növeli, a lúgos tartományok pedig csökkentik a zavarosságot.

2/ A protaminszulfát a fibrinogént oldatából kicsapja. pH=7 alatt a zavarosság nő, pH=7 felett csökken.

3/ A fibrinogén heparinnal és protaminnal történő kicsaphatósága ha a heparin koncentrációját változtatjuk minimum-maximum, ha a protaminét maximum-minimum görbével ábrázolható. A görbék extrém értékeinek helyei a heparin és a protamin koncentrációjától függenek, viszont extinkció értékük az oldat fibrinogén koncentrációjától függ. A komponensek bemérési sorrendjének változtatása a minimumok és maximumok extinkció értékében változást hoznak létre.

A heparin, valamint a protaminszulfátnak a thymol turbiditási próbára gyakorolt hatásának vizsgálata az alábbi eredményeket szolgáltatatta:

1/ A heparin a thymolturbiditást koncentrációjától függő mértékben csökkenti, a zavarosságot feltisztítja. A heparinos plazma nem alkalmazható a thymolturbiditási reakción alapuló kóros globulinok meghatározására.

2/ A protamin a thymolturbiditást koncentrációjától függő mértékben növeli.

3/ Ha a heparin és a protamin együtt vannak jelen a rendszerben, úgy mind a kettő külön-külön kifejti hatását. Protaminnal neutralizált heparinos vér szintén nem alkalmazható a thymolturbiditási vizsgálatokhoz.

Summary

I elaborated with a diphenylamine reagent a method for the determination of heparin. By means of the method the concentration of free heparin can be estimated. I applied it for the examination of the binding of heparin to the serum proteins. The amount of the free and bound heparin respectively, depends, if the concentration of the protein is identical, partly upon the concentration of the heparin and partly on the pH of the solution. In a highly acid medium at pH 1-2 the concentration of free heparin is higher and that of the bound one lower than the values measured at pH 6-7. With the increasing of the concentration of the heparin the quantity of the free heparin increases in the case of both pH values. The amount of the bound heparin at pH 1-2 increases until a certain heparin concentration then it remains unchanged, whereas at pH 6-7 it increases. In the case of a highly acid pH the value of the dissociation constant increases if the concentration of the heparin rises, at pH 6-7 it is constant.

In the blood the heparin is localised in the plasma and serum fractions respectively. The serum introduced in vivo into the organism is completely bound to protein.

On the action of heparin the electrophoretic picture of the proteins changes. The mobility of the protein heparin complex ~~complex~~ is greater than the migration rate of the albumin. The protein content of the complex increases till pH 7 and then decreases.

The turbidity caused by the heparin-fibrinogen complex can be plotted onto a maximum curve. As the concentration of the fibrinogen increases the heparin quantity needed for the maximal precipitation, as well as for the solution of the complex increases. At acid pH-s the turbidity increases and at alkaline ones it diminishes. Protamin sulphate precipitates fibrinogen from its solution. Below pH 7 the turbidity increases, over this pH it decreases.

The ability to precipitate fibrinogen with heparin and protamin may be plotted on a minimum-maximum curve, if the concentration of the heparin is changed, and on a maximum-minimum curve if that of the protamin is changed. The localisation of the extreme values on the curve depend upon the heparin and protamin concentration of the solution, whereas their extinction values depend on the fibrinogen concentration. A change in the succession of the measurement of the components causes a change in the extinction values of the minimas and maximas. The decrease of the thymol turbidity depends upon the concentration of the heparin. Heparinous plasma cannot be used for the determination of pathologic globulins on the base of the thymol turbidity.

The extent of the increased turbidity due to acid pH-s decreases according to the heparin concentration.

Protamin decreases the thymol turbidity to an extent depending upon its concentration.

If heparin and protamin are together present in

the system both exert their action separately. Blood containing heparin neutralised with protamin is also not suitable for thymol turbidity examinations.

- - - - -

A tanítvány őszinte köszönetével tartozom dr. Kovács Ödön docens urnak, hogy állandó tanácsaival és segítségével munkám elkészítését támogatta.

Köszönettel tartozom továbbá dr. Petri Gábor professzor urnak, aki lehetővé tette számomra azt, hogy az Orvostudományi Egyetem I. sz. Sebészeti Klinikájának laboratóriumában munkámat elkészíthessen.

IRODALOMJEGYZÉK

1. McLean J.: Amer.J.Physiol. 41, 250 /1916/
2. Howell W.H.: Amer.J.Physiol. 71, 553 /1924/25/
3. Charles A.F. and Scott D.A.: Biochem.J. 30, 1927 /1936/
4. Jorpes J.E.: Biochem.J. 29, 1817 /1935/
5. Wolfrom M.L. and Rice F.A.H.: J.Amer.Chem.Soc. 68, 532
/1946/
6. Fürth O., Herrmann H. and Scholl R.: Biochem.Z. 271, 395
/1934/
7. Wolfrom M.L. and McNeely W.H.: J.Amer.Chem.Soc. 67, 748
/1945/
8. Jorpes J.E., Boström H. and Mutt V.: J.Biol.Chem. 183,
607 /1950/
9. Wolfrom M.L., Montgomery R., Karalinos J.V. and
Rathgeb P.: J.Amer.Chem.Soc. 72, 5796 /1950/
10. Jaques L.B. and Waters E.T.: Amer.J.Physiol. 34, 112
/1940/
11. Harbet R. and Winterstein A.: Experientia, 8, 41 /1952/
12. Bell H.J.: In: XIX. International Physiological Congress
Montreal August 31th to September 4th. /1953/,
Abstracts of Communications, p.200./Montreal/
13. Grönwall A., Ingelman B. and Mosimann H.: Uppsala Läk
Fören. Förh., u.f. 50, 397 /1945/
14. Neely W.B.: The chemical structure of heparin and related
compounds. Research Report of the Ohio State University
Research Foundation /1953/
15. Bottle R.T., Gilvert G.A., Greenwood C.T. and Saad K.N.:
Chem.and Ind. /Rec/, p.451 /1953/

16. Jorpes J.E.: Heparin in the treatment of thrombosis:
an account of its chemistry, physiology and applica-
tion in medicine, 2nd ed. Cumberlege, London /1946/
17. Walton K.W. and Ricketts C.R.: Brit.J.exp.Path.35,227
/1954/
18. Awe W. and Stüdemann K.D.:Arzneim.Forsch. /Drug.Res./
8, 98-99 /1958/
19. Wilander O.: Shaud.Arch.Physiol.Suppl.No.15. /1938/
20. Demole V. and Reinert M.: Arch.exp.Path.Pharmak. 158,
211 /1930/
21. Bergström S.:Naturwissenschaften, 23, 706 /1935/
22. Jorpes J.E. and Bergström S.: Biochem.J. 33, 47 /1939/
23. Karrer P., Usteri E., Camerino B.: Helv.Chim.Acta 27,
1422 /1944/
24. Ricketts C.R.: Research, Lond. 6, Suppl, p.17 /1953/
25. Doczi J., Fischman A. and King J.A.: J.Amer.Chem.Soc.
75, 1512 /1953/
26. Foster A.B., Martlew E.F. and Stacey M.: Chem.&Ind.p.
899 /1953/
27. Riley J.F.: J.Path.Bact. 65, 471 /1953/
28. Werle E., Amann R.: Klin.Wochenschr.J. 34, 624 /1956/
29. Holmgren,H. and Wilander O.: Z.mikr.-anat.Forsch.42,
242 /1937/
30. Comptey A.L. and Schedorf J.G.: Amer.J.Physiol. 133,
562 /1941/
31. Jaques L.B., Monkhouse F.C. and Stewart M.: J.Physiol.
109, 41 /1949/
32. Jaques L.B.:Rev.Hemat. 7, 74 /1952/
33. Walton K.W. : Brit.J.Pharmacol. 9, 1 /1954/
34. Jaques L.B., Waters E.T. and Charles A.F.: J.Biol.Chem.
144, 229 /1942/
35. Jalling O. Jorpes J.E. and Linden: Quart.J.Pharm. 19,
96 /1946/
36. Studer A. and Winterstein A.: Helv.Physiol.Acta 9,
6-32 /1951/

37. Fritchard J.: J.of Pharm. and Pharm. 8, 523 /1956/
38. Blombäck B., Blombäck M.: Acta Chirurgica Scandinavica
245, 259 /1959/
39. Kaller H.: Arch.int.pharmacodyn. XCIX. 2 /1954/
40. Refu I. and Vestergaard: Scand J.Clin. and Lab.Invest.
6, 4 /1954/
41. MacIntosh F.E.: Biochem.J.35, 776 /1941/
42. Awe W. and Studemann K.D.: Arzneim.-Forsch. 7, 715 /1957/
43. Freeman L., Engelberg H. and Dudley A.: Am.J.Clin.Path.
24, 599 /1954/
44. Monkhouse F.C. and Jaques L.B.: J.of Lab. and Clin.Med.
5, 782 /1952/
45. Nilson Inga Marie: Acta Medica Scandinavica 150 /1954/
46. Clarke D.W. and Monkhouse F.C.: Canad.J. med.Sci.31, 616
/1953/
47. Chargaff E., Ziff M. and Moore D.H.: J.biol.Chem. 139,
383 /1941/
48. Hoch H. and Chanutin A.: J.biol.Chem. 197, 503 /1952/
49. Hahn P.F.: Science 98, 19 /1943/
50. Volkert M.: Acta physiol.scand.Suppl.No. 15 /1942/
51. Seegers W.H., Warner E.D., Brinkhous K.N. and Smith H.P.:
Science 96, 300 /1942/
52. Quick A.J.: Physiol.Rev. 24, 297 /1944/
53. Brinkhous K.M., Smith H.P., Warner E.D. and Seegers W.H.:
Amer.J.Physiol. 125, 583 /1939/
54. Chargaff E., Ziff M. and Cohen S.S.: J.Biol.Chem. 136,
257 /1940/
55. Bürkl W.:Wien.Klin.Wachr. 23, 411 /1952/
56. Riley J.F.: Lancet 1, 841 /1954/
57. Jaques L.B., Napke E. and Levy S.W.: Circulation Res. 1,
321 /1953/

58. Jaques L.B.: J.Biol.Chem. 133, 445 /1940/
59. Jaques L.B. and Keeri Szanto E.: Canad.J.med.Sci. 30,
353 /1952/
60. Marbet R. and Winterstein C.: Helv.Physiol.Acta 9, 24
/1951/
61. Fischer A.: Bioche.Zeitschrift 244, 464 /1932/
62. Fischer A. and Astrup T.: Biochem.Z. 278m, 326 /1935/
63. Amann R. und Werle E.: Klin.Wochenschr.J. 35, 22 /1957/
64. Harold B., Eiber and Danishefsky: Soc.Exp.Biol.Med. 102,
18 /1959/
65. Jaques L.B.: Biochem.J. 37, 189 /1943/
66. Walton K.W.: Brit.J.Pharmacol. 7, 370 /1952/
67. Thomas L., Smith R.F. and Korff R.W.: Proc.Soc.Exper.Biol.
and Med. 86, 813 /1954/
68. Godal H.C.: Scand.J. of Clin. and Lab. Invest./1960/12, 1
69. Mylon E., Winternitz M.C. és Sütő-Nagy G.J.: J.Biol.Chem.
143, 21 /1942
70. Fantl P., Everard B.: Austrian J.Exper.Biol. and M. Sc.
28, 253 /1950/
71. Portmann A.F. and Holden W.D.: J.Clin. Investigation 23,
1451 /1949/
72. Godal H.C.: Scand.J. of Clin. and Lab. Investigation, 12,
4 /1960/
73. Reiner M. and Cheung A.L.: Clin.Chem. 5, 5 /1959/
74. Jensen R., Snellman O. and Sylven B.: J.Biol.Chem. 174,
265, /1948/
75. Katz S., Gutfreund K., Shulman S. and Ferry J.D.:
J. Am. Chem. Soc. 74, 5706 /1952/
76. Smith R.T. and von Korff R.W.: J.Clin. Investigation 36,
596 /1957/
77. Astrup T. and Piper J.: Acta Phys. Scand. 11, 211 /1946/
78. Bálint P. és Hegedűs A.: Klinikai Laboratoriumi Diag-
nosztika.

79. MacLagan W.F.: Brit.J.Exper.Path. 25, 234 /1944/
80. Saifer A.: Am.J.Med. 13, 730 /1952/

