

Clinica medicală nr. 1 din Tg.-Mureș (cond : prof. P. Dóczy, doctor-docent,
medic emerit al Republicii Socialiste România)

CERCETĂRI PRIVIND SISTEMELE DE STABILIZARE ȘI DE LIZĂ A FIBRINEI ÎN BOLI REUMATICE

Nota I.: Cercetări din domeniul stabilizării fibrinei

Eva Kótaġ Lakatos

„Fibrinoidul”. formațiunea tisulară care apare în diferite boli reumatice, prezintă o mare variabilitate. După una dintre teorii, fibrinoidul se produce prin infiltrație de fibrinogen plasmatic și de nucleoproteină, care din cauza insolubilității lor ar forma nucleul degenerativ. Teoria aceasta, confirmată de datele mai vechi ale lui *Thomas, Consden, Ziff, Albertini*, a îndreptat atenția cercetărilor spre transformarea fibrinogenului în fibrină și spre fibrinoliză.

Determinând fibrinogenemia și fibrinoliza în endocarditele reumatismale, Moga și colab. (12, 13) au arătat că în cazurile recidivante pe lângă o creștere moderată a fibrinogenemiei, fibrinoliza este scăzută, mărindu-se activitatea inhibitorilor plasminei.

Cu ocazia determinărilor anterioare, am observat și noi (9) că activitatea fibrinolitice spontană a sîngelui este scăzută la cei suferinzi de reumatism cronic. Aceste date sînt în concordanță și cu rezultatele lui Kopec (6), Goryachkin (4) și de Chakrabarti (1). Plecînd de la observațiile acestea, tot Chakrabarti, Fearnley și colab. au studiat influența cortizonului și ACTH și au constatat creșterea fibrinolizei sub influența acestui tratament corticosteroid. După părerea lor, primul efect al corticosteroidelor este tocmai creșterea activității fibrinolitice, avînd drept consecință atenuarea fenomenelor inflamației. Ei cred că a sosit timpul cînd fibrinoliza trebuie să fie privită ca un sistem fiziopatologic al organismului, cu extindere atît asupra aparatului cardiovascular, cît și asupra celorlalte organe și țesuturi. Pilgeram, Amundson și Lofgren (14) au studiat efectul activator al corticosteroidelor asupra plasminogenului uman, arătînd rolul acestor steroizi în controlul metabolismului profibrinolizinei.

Este verosimil, că procesele care se petrec în țesuturi, se reflectă într-o oarecare măsură în procesele de coagulare și fibrinoliză plasmatică. Punctul de plecare al așa-numitei degenerescențe fibrinoide poate să fie tocmai fibrinoliza scăzută. Investigațiile cunoscute pînă în prezent nu ne dau informații privind limita procesului fibrinolitic. Care este de fapt cauza pretinsei insuficiențe a dizolvării fibrinei? Lipsa activatorului sau enzimei; — inhibiția activatorului sau enzimei; — sau substratul însuși, modificat calitativ și devenit astfel mai rezistent?

Cercetările noastre anterioare au avut drept scop studierea calitativă a fibrinei (7). După rezultatele noastre, fibrina coagulată a sîngelui bolnavilor reumatice conține într-o proporție mai mare componentul glucidic în comparație cu fibrina din sîngele provenit de la sănătoși. Date similare sînt publicate de către Stoichița și colab. (17), care au studiat compoziția fibrinogenului, determinînd și cantitatea glucidelor fracționate. Starnes și colab. (15) au observat creșterea conținutului glucidic al fracțiunii euglobulinice la bolnavii suferinzi de artrită reumatoidă. În cursul procesului de transformare al fibrinogenului în fibrină se eliberează din fibrinogen și o cantitate de glucide. După rezultatele cercetărilor noastre și fibrina bolnavilor cu artrită reumatoidă conține într-o proporție mai mare componentul glucidic strîns legat de proteină.

Am efectuat și determinări polarografice, folosind concentrații standard de fibrinogen, 200 mg%. Activitatea polarografică a soluțiilor de fibrinogen pregătite din sîngele bolnavilor a arătat o diferență netă în raport cu fibrinogenul celor sănătoși (8).

În lucrarea de față prezentăm rezultatele determinărilor privind activitatea sistemelor enzimatică avînd ca substrat fibrina. Am studiat în primul rînd efectul factorului de stabilizare a fibrinei (FSF, factorul plasmatic XIII) asupra formei provizorii a polimerului de fibrină, solubil în soluție de uree. După ipoteza noastră modificarea cantitativă a componentului glucidic poate să aibă drept consecință modificarea calitativă a fibrinei. Comportarea ca substrat a fibrinei poate fi modificată, fie din cauza structurii spațiale eventual schimbate, fie din cauza grupelor blocate de aminoacizi. Nici rolul fiziologic al componentului glucidic nu este încă elucidat, este cert doar că în cursul stabilizării fibrinei se eliberează o cantitate de glucide.

Cercetări în domeniul stabilizării fibrinei

Este cunoscut că prima fază a transformării fibrinogenului în fibrină se datorește trombinei. Fibrinogenul este o proteină bogată în glucide, cu o greutate moleculară de cca. 340.000, molecula ei conținând 6 lanțuri peptidice, este alcătuită din două jumătăți simetrice. Lanțurile peptidice sînt legate între ele prin punți disulfidice. În timpul formării fibrinei scade greutatea moleculară cu aproximativ 3%, schimbîndu-se între timp și resturile de aminoacizi N-terminali, rămîind nemodificați aminoacizii C-terminali (Bailey, cit. 11). Identificînd aminoacizii N-terminali cu metoda lui Sanger sau Edman s-a găsit că dintre 6 lanțuri peptidice ale fibrinogenului la două apare tirozina, la celelalte patru lanțuri aminoacizii diferă de la specie la specie. La om la două lanțuri se găsește alanina, la alte două, resturi de acid piroglutamic. Sub acțiunea trombinei se scindează o legătură arginină-glicină în apropierea N-terminală, rămîind în molecula fibrinei în pozițiile N-terminale 2 tirozine și 2 glicine. La pozițiile C-terminale atît la fibrinogen, cît și la fibrină se găsesc resturi de arginină (11).

Asupra punctului de atac al trombinei s-au imaginat mai multe teorii. După Lorand punctul de atac este determinat de secvența aminoacizilor în vecinătatea legăturilor arginin-glicină, în primul rînd de peptidul bogat în acizi dicarbonici. Laki caută să explice factorul determinant al punctului de atac al trombinei prin prezența glucidelor legate de lanțuri peptidice. Polimerizarea monomerului de fibrină are loc spontan, din cauza electroneutralității, ce apare în urma eliberării peptidelor acide. Structura polimerului depinde de pH-ul mediului, de forța ionică și de temperatură. Tot după Laki polimerizarea longitudinală este consecința scindării fibrinopeptidului A, iar polimerizarea transversală se întîmplă după scindarea peptidului B. Între monomeri se formează legături de hidrogen, la care participă în primul rînd radicali de histidină și de tirozină. Fibrina „S” solubilă astfel formată este depolimerizabilă cu ajutorul soluțiilor de săruri nenedaturante (uree, NaBr) efectul fiind reversibil. Formarea fibrinei „I” insolubilă și stabilă este consecința influenței unei enzime noi (Loewy, cit. 5). Această enzimă, cunoscută ca factor stabilizant al fibrinei (FSF), sub aspectul proprietăților ei fizice este o proteină foarte asemănătoare fibrinogenului. Conține grupări —SH libere, activitatea ei crește în prezența cisteinei, ea fiind activă numai într-o formă redusă. Enzima se adsoarbe de fibrină, activarea ei necesită însă prezența trombinei și a ionilor de Ca. Enzima activă modifică structura polimerului prin formarea legăturilor covalente, cheagul astfel format este deja insolubil în soluții de uree și de acid monocloroacetic 1—2%. După Laki în efectul FSF are un rol determinant componentul glucidic al fibrinei, sistemul enzimatic fiind inactivat de neuraminidază. Legătura covalentă se formează între un rest de glicină N-terminală și între lanțul lateral al unui monomer de fibrină vecină. După Loewy are loc o transamidare, eliberîndu-se amoniac. Laki a pus în evidență faptul că FSF scindează și glucidele. Deci, FSF catalizează o transamidare între glicina N-terminală și o grupare beta-carboxilică a restului de acid aspartic, aparținînd unui alt lanț peptidic, cu eliberare de amoniac și glucide (5). Stabilizarea nu are un caracter de „totul sau nimic” există și stabilizări intermediare (Loewy, cit. 5).

Proprietățile optice ale fibrinei „S” și „I” nu diferă între ele. — după Duckert (cit. de 5) nici structura lor electronomicroscopică nu e diferită. Ele se deosebesc însă în privința rezistenței lor mecanice cît și a solubilității lor.

Pe baza considerentelor de mai sus am urmărit — aplicînd metoda lui Lorand (bazată pe solubilitatea fibrinei) — efectul factorului de stabilizare asupra fibrinei, la un lot de 48 bolnavi suferinzi de poliartrită cronică evolutivă și la 61 de persoane sănătoase.

Metoda de lucru

Am coagulat în prezența trombinei la 37° C prin recalcare, plasma oxalată a singelui indivizilor bolnavi și sănătoși. După diferite timpuri de incubație am dizolvat fibrina timp de 24 de ore în soluție de uree 30%. În continuare am spălat și am hidrolizat fibrinele, determinând apoi cantitatea de fibrină insolubilă pe baza conținutului de tirozină cu ajutorul reactivului Folin-Ciocalteu.

Singele recoltat pe soluție de oxalat de sodiu 1.34% în proporție de 9:1, s-a centrifugat timp de 5 minute la 3.000 T/min. Plasma decantată s-a prelucrat în timp de o oră după recoltarea singelui, în modul următor:

în 7 eprubete serologice: 0,2 ml plasmă

0,1 ml tampon Michaelis (pH = 7,35, n = 0,1)

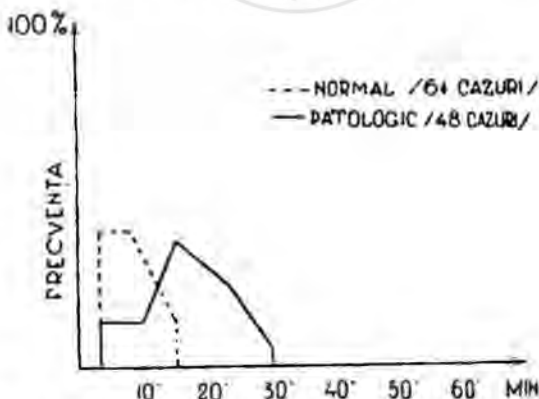
0,2 ml clorură de calciu M/40, care conține pe ml

cantitatea de trombină ce coagulează 1 ml plasmă în 25 de secunde

Am incubat eprubetele la 37° C timp de 3,7 1/2, 15, 22 1/2, 30 și 60 de minute. După trecerea timpului de incubare am adăugat în eprubete cite 3 ml soluție de uree 30%, despărțind cheagul de peretele eprubetei printr-o agitare ușoară. După 24 de ore, fibrina nedizolvată am spălat-o de 3 ori cu apă distilată, am adăugat la fibrina spălăată 0,5 ml NaOH 10%, și am pus eprubetele în baie de apă fierbinte, timp de 30 de minute. După răcire am adăugat 2,5 ml apă distilată, 3 ml sol. de Na₂CO₃ 20% și 0,5 ml reactiv Folin-Ciocalteu diluat. După 10 minute am citit extincțiile la fotometrul Pulfrich, folosind filtrul S-61, contra apei.

Rezultate și concluzii

La 83,5% a cazurilor grupei de control cantitatea maximă de fibrină insolubilă s-a format după un timp de 3 și 7 1/2 minute de incubație. La diferența de 14,7% s-a atins cantitatea maximă după 15 minute de incubație. În majoritatea cazurilor, în eprubetele conținând plasma bolnavilor s-a atins maximumul de fibrină insolubilă după un timp de 15 și 22 1/2 minute de incubație și anume într-un procentaj de 64,6% (graficul nr 1). Din curba de frecvență deducem că timpul de stabilizare al fibrinei în cazul bolnavilor reumatici se prelungește față de al sănătoșilor.



Graficul nr. 1: Graficul frecvenței cantității maxime de fibrină insolubilă în soluție de uree

Trebuie să luăm în considerare însă faptul că în sistemul nostru de incubare începe pe parcurs și liza fibrinei. Aceasta acționează în sens contrar stabilizării cheagului și formării cantității maxime de fibrină în timp. Este posibil că la normali, fibrinoliza fiziologică împinge spre stînga curba cantității maxime a fibrinei (vezi graficul nr. 1) în timp ce în cazul bolnavilor cu reumatism, lipsa fibrinolizei este factorul care face posibilă formarea unei cantități maxime de fibrină cu apariție mai tardivă. În cele din urmă o cantitate maximă de fibrină formează rețeaua elastică, strînsă și rezistentă.

Punctul de atac al sistemului fibrinolitic este fibrina. În cazul scăderii activității FSF-ului polimerul format este mai ușor solubil, decît fibrina „I” insolubilă, adevăratul substrat al fibrinolizei. Deci, FSF poate fi considerat inhibitorul fiziologic al fibrinolizei. La bolnavii reumatici fibrinoliza este scăzută, deci este puțin probabil că prelungirea timpului de stabilizare este cauzată de lipsa FSF. Tyler și Lack au pus în evidență un factor tisular, asemănător cu acest factor plasmatic XIII (FSF), care ar fi responsabil pentru activitatea antifibrinolitică a extractelor tisulare (Duckert, 2). Observația aceasta este însemnată, deoarece confirmă prezența unei noi perechi de factori cu funcție similară, prezentînd un nou argument pentru unitatea proceselor ce se petrec în țesuturile lichide și solide ale organismului.

Sosit la redacție: 28 aprilie 1967.

Bibliografie

1. CHAKRABARTI R., FEARNLEY G. R., ELISABETH D. HOCKING: British Med. Journal (1964), 1, 534; 2. DUCKERT F.: Nouv. Rév. Fr. d'Hémat. (1965), 5/2, 365; 3. FEARNLEY G. R., CHAKRABARTI R., ELISABETH D. HOCKING: The Lancet (1965), 1, 9; 4. GORYACHKIN YA. KH.: Terap. Arkh. Kuibîșev (1964), 36/9, 7; 5. JOSSO F., FAURE A.: Nouv. Rév. Fr. d'Hémat. (1965), 5/2, 316; 6. KOPEC M., AMATUNI H.: Pol. Tyg. Lek. (1961), 16/34, 1301; 7. KÓTAY LAKATOS É., KIFOR E., FALL A.: Revista Medicală (1964), 2, 176; 8. KÓTAY LAKATOS É., KIFOR E., KIFOR OLGA: Lucrare comunicată la Conf. Reg. „Metode și tehnici în laboratorul clinic” 25—27 sept., 1964, Timișoara; 9. LAKATOS É.: Revista Medicală (1962), 4, 479; 10. LORAND L.: Arch. Biochem. Biophys. (1964), 105/1, 58; 11. MÉNACHÉ DORIS: Nouv. Rév. Fr. d'Hémat. (1965), 5/2, 309; 12. MOGA A., 93; 13. MOGA A., CUCUIANU M., MISSITS P.: Med. Int. (1960), 12, 505; 14. PILCUCUIANU M., PITEA P., MACAVEI E.: Stud. Cerc. Med. Int. Cluj (1961), 13, 1, GERAM L. O., AMMUNDSON B. A., LOFGREN P. E.: Thromb. Diath. Haemorr. (1964), II/1—2, 94; 15. STARNES W. R.: Proc. Soc. Exp. Biol. (1961), 106/4, 882; 17. STOICHIȚA MICHAELA, CIOBANU V., MARIA TEICAN-GHEORGHIU, VLĂDESCU C.: Stud. Cerc. Med. Int. (1963), 1, 97; 18. TYLER M.: Nature (1964), 202, 1114