

ADATOK A HEPARIN-ELLENES HATÁS VIZSGÁLATÁHOZ KÍSÉRLETES HIPERGLIKOPROTEINÉMIÁBAN

Bukaresti L., Kovács E., Sikó Gabriella, Făgărășan Maria, Goina Eugenia,
Nagy Ilona, László A., Hobai Șt.

Előző kísérleteink során megállapítottuk (9, 10, 11), a szakirodalomból ismert adatok többségével összhangban (25, 21), hogy a savoldékony szérum-glikoproteinek bioszintézisében a máj elsőrendű szerepet játszik. Az utóbbi 10—15 évben egyre gyakrabban jelennek meg olyan cikkek, amelyek a bioszintézis és szerkezet mellett ezek élettani szerepével kapcsolatos kérdéseket is tárgyalnak. Így a haptogloblin, vagy az α_1 -antitripszin már régóta ismert és jól körülhatárolt szerepét taglaló munkákon kívül, számos figyelemre méltó dolgozat jelent meg az α_1 -savanyú glikoprotein (α_1 -SGP) élettani hatásairól, mint amilyen a progeszteron hatástalanítása (30), a részleges hepatekтомiát követő májregenerálódás bénítása (23), a grippe-virussal kiváltott hemagglutináció gátlása (31) stb. Az α_1 -SGP szerepét vizsgálva Andersen és Godal (3) azt találták, hogy ez a glikoprotein, izolálva, kifejezett antiheparin-hatást mutat — in vitro.

A jelen dolgozat, egy kísérlet-sorozat (12, 15, 18, 28) szintéziseként beszámol azokról az adatokról, amelyeket erről a hatásról — in vivo — nyertünk, kísérletesen kiváltott hiperglikoproteinémiás és heparinnal kezelt állatokon.

Vizsgálati anyag és módszer

Kísérleteinket 500—750 g testsúlyú him tengerimalacokon végeztük, a következő csoportosítással:

Az 1. állatcsoport (8 állat) kontrollként szerepelt és feláldozás előtt 15 perccel i.kard. 0.14 ml 100 tests. g 0.9% NaCl oldatot kapott. A 2. állatcsoportot (9 állat) gyulladásoz hiperglikoproteinémia kiváltása céljából i.m. 0,2 ml 100 tests.g 2% Corein₂-oldattal (carrageenin-tartalmú gyógyszerkészítmény) kezeltük. Feláldozás előtt 15 perccel ezek az állatok is i.kard. 0.14 ml 100 tests. g 0.9% NaCl oldatot kaptak. A 3. állatcsoportnak (8 állat) szakrifikálás előtt 15 perccel i.kard. 7 I.E. heparin 100 test. g

oldatot fecskendeztünk be (a heparin-oldatot úgy hígítottuk fiziológias konyhasóval, hogy 0,14 ml elegy 7 I.E. heparint tartalmazzon). A 4. állat-csoport (8 állat) kombinált kezelésben részesült, nevezetesen Coreïne- és heparin-oldatot is kapott, a 2. és 3. csoportnál leírt módon.

A plazma-mintát (1 tf 3,8⁰ Na-citrát és 4 tf vér) és az alvadási időhöz a vérmintát szívpunkcióval nyertük, vérsavóhoz pedig az állat elvezetése útján jutottunk.

A savoldékony glikoproteinek össz-koncentrációját a vérsavó perklórsavas szűrletének polarogramja alapján becsültük meg (14). A vérsavó perklórsavas szűrletéből foszfovolftrámsavval kicsapott szeromukoidnak meghatároztuk a szialsav (1), valamint össz-hexóz tartalmát (29) is.

A heparint *Studer* és *Winterstein* módszerével (24) határoztuk meg. Eszerint antitrombin-hatást mértünk és egy kalibrációs görbe alapján I.E. heparin 1 ml plazmában fejeztük ki.

A trombin-időt a szokásos módon mértük, ismert aktivitású trombin-oldatot használva (22). Az alvadási idő meghatározására az ismert, egyszerű módszert választottuk: percekben mértük az alvadás kezdetének és befejezésének idejét (7).

A vérsavó antitripszin-kapacitását (ATK) *Fritz* és mtsai. (16) módszerével állapítottuk meg (N-benzoilarginin-p-nitranilid — BAPNA — szubsztráton az ATK 90—95⁰ -ban az α_1 -antitripszinnek — α_1 AT — tulajdonítható).

A fibrinogént *Ratnoff* és mtsai. kolorimetriás módszerével (26) az össz-kalciumot automatizált kolorimetriás titrálásra alkalmas mikromódszerrel (27) határoztuk meg.

Az adatok statisztikai értékelése *Student* t-próbájával történt.

Vizsgálati eredmények és megbeszélés

A kísérleti eredményeket az 1. táblázat foglalja össze a kontroll-csoporton nyert értékekhez viszonyított, százalékokban kifejezve.

Előző kísérleteinkkel megegyezően, a Coreïne-nel kezelt állatoknál a glikoprotein-szint jelentősen nő (+133,4⁰ μ). A heparin-al kezelt állatoknál is észlelhető egy igen kis fokú, statisztikailag nem szignifikáns növekedés. Ezzel szemben a kombinált kezelésben részesült állatoknál a glikoprotein-szint emelkedése nagymértékű (+158,5⁰ μ), szignifikánsan nagyobb, mint a csak Coreïne-nel kezeltéknél. A glucidkomponensek mennyiségi változásai általában elég hűen tükrözik a vér savoldékony össz-glikoprotein szintjének változásait. Így a Coreïne-nel kezelt állatoknál a szialsav- és hexóz-koncentráció egyaránt szignifikánsan nőtt, míg heparin-kezelés esetén csak enyhébb növekedést mutat. A kombinált kezelés hatására viszont ismét igen magas értékeket mértünk.

A heparinózott állatoknál a heparinémia — természetesen — megnőtt, kísérleti körülményeink között a mérhetőség határa felé (> +220⁰ μ). Csökken azonban a Coreïne-kezelt, vagyis a nagymértékben hiperglikoproteinémiás állatoknál, a kontroll csoportéhoz képest 46⁰ μ -kal.

Ennél lényegesebb és meggyőzőbb az a tény, hogy a heparinémia ugyanilyen alacsony szintű (—46,7⁰ μ) a kombinált kezelésben részesített állatoknál is. Ha tekintetbe vesszük, hogy a heparinémia mérése az antitrombin-hatás alapján történt, eredményeinkből arra következtethetünk,

1. táblázat

Allatcsoport	Glikoproteinek (Polarogram)	Sziálsav	Hexózok	Heparin	Trombin-idő	Alvadási idő		ATK	Fibrinogen	Össz-kalcium
						Alvadás kezdete	Alvadás vége			
2. sz. Corefine-nel kezelt (n=8)	+133,4 % P <0,001	+79,1 % <0,001	+83,8 % <0,001	-46 %	-8,8 %	0%	0%	+10,33 % >0,05	+47,2 % <0,02	-8,0 % >0,1
3. sz. Heparinnal kezelt (n=8)	+2,42 % P >0,8	+26 % <0,05	+30,6 % >0,05	+220 %	+3500 %	+100 % >0,05	+51,5 % >0,1	+44,8 % <0,001	+62,2 % <0,01	-35,7 % <0,001
4. sz. Corefine-nel + heparinnal kezelt (n=8)	+158,5 % P <0,001 P' <0,05 P'' <0,001	+79,5 % <0,001	+204 % <0,001 <0,001 <0,001	-46,7 %	+156 %	+26,7 % >0,4 >0,4 >0,2	+25,7 % >0,3 >0,4 >0,5	+0,71 % >0,9 >0,1 <0,001	+61,3 % <0,001	0%

P=kontroll csoporthoz viszonyítva; P'=2. sz. állatcsoporthoz viszonyítva; P''=3. sz. állatcsoporthoz viszonyítva

hogy a magas glikoprotein-szint gátolta a bevitt heparin hatásának kifejtésében. Ezzel összhangban van az a tény, hogy a trombin-idő enyhén megrövidült a hiperglikoproteinémiás állatoknál, jelentősen megnyúlt a heparinozottaknál és csak mérsékelten hosszabbodott meg a kombináltan kezeltéknél. Ezeket az eredményeket megerősítik az alvadási-idő mérések is. Az ezúttal nyert értékek is, habár különbségeik nem szignifikánsak, de megfelelnek a trombin-idő változásainak (a Coreïne-kezelt állatoknál változatlan, a heparinozottaknál jobban, a kombináltan kezeltéknél lényegesen kevésbé megnyúlt), annak ellenére, hogy az alvadási időbe sok más faktor is beleszól.

Az ATK csak a heparinozott állatoknál mutat szignifikáns változást: csaknem 45 % növekedést a kontroll csoporttal szemben. Nem jelentkezik ez a heparin-hatásra beálló növekedés a kombináltan kezelt csoportnál, bár csak Coreïne-adagolás után enyhe növekedési tendenciát észleltünk. Az α_1 -AT — kísérleti körülményeink között nagyrészt ennek tulajdonítható az ATK — plazmin-inhibitor (6), ugyanakkor antitrombin hatású faktor (20). Lehetséges, hogy a heparin-hatás egyik mechanizmusa éppen az α_1 -AT koncentráció növelése útján valósul meg.

Ha szem előtt tartjuk, hogy az α_1 -AT maga is egy savoldékony glikoprotein és rendelkezik az előbb említett két hatással, felmerül annak a szükségessége, hogy a jövőben vizsgáljuk az α_1 -SGP és α_1 -AT viszonyát különböző kóros állapotokban és e viszony változásainak hatását a véralvadásra.

A fibrinogén-koncentráció mindhárom kezelés hatására szignifikánsan nőtt a kontrollhoz képest. Gyulladásos folyamatokban a fibrinogénémia növekedése jól ismert klinikai tény. A heparinozott állatoknál pedig, a hiperheparinémia, amely a trombin-idő megnyúlását okozza, valószínűleg elindít egy azt kivédő folyamatot, amely fokozott fibrinogén szintézishez vezet. Ez az elképzelés beilleszthető azokba a klinikai megfigyelésekbe, amelyek a heparin-kezelésre adott válaszra vonatkoznak (8).

A szérum-Ca a heparinnal-kezelt 3. állatcsoportnál szignifikánsan csökkent, a többinél nem változott. A hiperheparinémiát kísérő magas fibrinogén-szint és ugyanakkor a Ca csökkenése összhangban van olyan megfigyelésekkel, hogy a fibrinogén csökkenti egyes alvadási faktorok aktíválásához szükséges magas Ca-szintet (19).

A Coreïne hiperglikoproteinémia kiváltása útján a trombin-idő csökkenése irányában hat, de ugyanakkor nem befolyásolja a kalcémiát (17). valószínűleg azoknak a kompenzáló rendszereknek köszönhetően, amelyek a véralvadás Ca-függő lépéseit gyorsan és hatékonyan szabályozzák.

Összegezve az ATK, fibrinogén és Ca viselkedésére vonatkozó adatokat, megállapíthatjuk, hogy ezek nincsenek ellentmondásban a többi vizsgált paraméter változásaival.

Tudatában vagyunk annak, hogy nagyon kockázatos volna szimplista módon értelmezni eredményeinket, egy annyira bonyolult folyamattal kapcsolatban, mint amilyen a véralvadás. Tekintetbe kell venni továbbá azt is, hogy a hiperglikoproteinémiát egy gyulladásos folyamat segítségével váltottuk ki s ez egymaga is számos következménnyel jár. Mégis, megállapíthatjuk, hogy mostani eredményeink (valamint az előzők is, 13) egybehangzanak Andersen és mtsai (3, 2, 5) in vitro kísérleteivel. (Megjegyzendő, hogy az említett szerzők izolált és tisztított α_1 -SGP-vel végez-

ték kísérleteiket, mi pedig a savoldékony összglykoproteineket vizsgáltuk. Jól ismert tény azonban, hogy ezek fő komponense /mintegy 80⁰₀-a éppen az α_1 -SGP.)

Mint hogy a heparint nem vegyi úton mértük, hanem biológiai hatása alapján, állíthatjuk, hogy eredményeink nem a heparin valamilyen bomlási folyamatát tükrözik, hanem sokkal inkább Andersen és Godal (4) megfigyelései mellett szólnak, miszerint az α_1 -SGP antiheparin-hatását sztérikus gátlás útján fejtené ki.

Az emberi patológiából számos olyan állapotot ismerünk amikor a glykoprotein-szint a vérben emelkedett. Ez arra késztet, hogy kiterjesszük a vizsgálatainkat klinikai anyagra is, feltételezve, hogy a hiperglykoproteinémia megnöveli a kezeléshez szükséges heparinadagot.

Végül megemlítjük, hogy a májnak elsőrendű szerepe van az α_1 -SGP szintézisében s a többi ismert mechanizmuson kívül, ennek az anyagnak az antiheparin-hatásával is közrejátszhatik a vérárvadás folyamatában.

Irodalom

1. Aminoff D.: Biochem. J. (1961), 81, 384; 2. Andersen P.: Haemostasis (1980), 9, 303; 3. Andersen P., Godal H. C.: Haemostasis (1977), 6, 339; 4. Andersen P., Godal H. C.: Thromb. Res. (1979), 15, 857; 5. Andersen P., Kierulf P., Elde A. T., Godal H. C.: Thromb. Res. (1980), 19, 401; 6. Bagdy D.: A vérárvadás orvosi biokémiája, Medicina, Budapest, 1977; 7. Bálint P., Hegedűs A.: Klinikai laboratóriumi diagnosztika, Művelt Nép, Budapest, 1955, 159; 8. Berceanu Șt. (szerk.): Hematologie clinică, Ed. Medicală, București, 1977, 873; 9. Bukaresti L.: Cercetări privind rolul ficatului în biosinteza glicoproteinelor serice acidosolubile, Doktor értekezés, București, 1972; 10. Bukaresti L., Făgărășan M., Sikó G., Nagy I., Kovács A., Almási S.: Revista Medicală (1978), 24, 51; 11. Bukaresti L., Făgărășan M., Sikó G., Nagy I., Roșca Șt., Szövérfi A., Kovács A.: Revista Medicală (1980), 26, 21; 12. Bukaresti L., László A., Hobai Șt., Sikó G., Nagy I., Făgărășan M., Kovács A.: Sesiunea științifică anuală de valorificare a cercetării medicale, Tg. Mureș, (1982), 8, 156; 13. Bukaresti L., Sikó G., Făgărășan M., László A., Furda P., Bedő A., Nagy I., Kovács A.: Sesiunea științifică anuală de valorificare a cercetării medicale, Tg. Mureș, (1981) 7, 173; 14. Bukaresti L., Sikó G., Nagy I., Erdélyi A., Hadnagy Cs., Módy E., Kovács A.: Revista Medicală (1981), 27, 81; 15. Făgărășan M., Nagy I., Sikó G., Bukaresti L., Kovács A.: Sesiunea științifică anuală de valorificare a cercetării medicale, Tg. Mureș, (1982), 8, 157; 16. Fritz, H., Trautshold I., Werle E.: Methoden der enzymatischen Analyse, II. köt., Szerk: Bergmeyer H. V., Akad. Verlag, Berlin, 1970, 1021; 17. Goina E., Făgărășan M., Bukaresti L., Kovács A., Hobai Șt.: Sesiunea științifică anuală de valorificare a cercetării medicale, Tg. Mureș, (1981), 7, 172; 18. Goina E., Kovács A., Bukaresti L.: Sesiunea științifică anuală de valorificare a cercetării medicale, Tg. Mureș, (1982), 8, 156; 19. Jackson C., Nemerson Y.: Ann. Rev. Biochem. (1980), 49, 792; 20. Lebreton De Vonne T., Mouray H.: Int. J. Biochem. (1980), 12, 479; 21. Lombart C., Sturgess J., Schachter H.: Biochim. Biophys. Acta (1980), 629, 1.; 22. Manta I., Cucuianu M., Benga G., Hodárnău A.: Metode biochimice în laboratorul clinic, Ed. Dacia, Cluj-

Napoca, 1976, 350; 23. Onda H.: Gann. Jap. J. Cancer Res. (1977), 68, 301, ref.: Ref. Zsurn. Biol. Him. (1977), 23. C. 48; 24. Perlick E., Beergmann A.: Gerinnungslaboratorium in Klinik und Praxis, Thieme Verlag, Leipzig, 1971, 284; 25. Putnam F. W. (szerk.): The plasma proteins, I—II. köt. Acad. Press. New York, 1975; 26. Ratnoff O. D., Menzie C. J., Astrup T.: J. Clin. Lab. Invest. (1965), 17, 57; 27. Siegmund P., Dulce H.: Z. Physiol. Chem. (1960) 320, 149; 28. Sikó G., Nagy I., Fägărășan M., Bukaresti L., Kovács A.: Sesiunea științifică anuală de valorificare a cercetării medicale, Tg. Mureș (1982), 8, 157; 29. Weimer H. E., Moshin J. R.: Am. Rev. Tuberc. (1952), 68, 594; 30. Westphal U.: Endocrinology (1963). 73, 504, id.: Schultze H. H., Heremans, J. F.: Molecular biology of human proteins, I. köt., Elsevier, Amsterdam, 1966, 189; 31. Whitehead P. H., Flevett T. H., Foster, J. R., Sammons H. G.: Nature (1965), 208 5013, 915.

A szerkesztőségbe érkezett: 1983. május 6.

L. Bukaresti, A. Kovács, Gabriella Sikó, Maria Fägărășan, Eugenia Goina, Ilona Nagy, A. László, Șt. Hobai

DATA ON THE STUDY OF ANTI-HEPARIN EFFECT IN EXPERIMENTAL HYPERGLYCOPROTEINAEMIA

In 500—750 g male guinea pigs, the authors have found, in hyperglycoproteinaemia produced by an inflammatory process — based on the effect of antithrombin —, reduced heparinaemia and slightly shortened thrombin time. In administering heparin, the heparin level remained low, and the thrombin time was considerably shorter than in the animals treated with heparin only.

The coagulation time behaved also similarly. No increase in the antitrypsin capacity of the serum after heparin therapy was noted in animals with hyperglycoproteinaemia. The level of fibrinogen and Ca showed the modifications as expected.

The authors discuss the anti-heparin effect of certain acid-soluble glycoproteins of the serum and the possible clinical aspects.