

## Egyszerű eljárás plazmavas meghatározására

Írta: Mándi Erika és Sztanyik László dr. orvosőrnagy.

Technikai munkatárs: Fogaras Katalin

Besugárzott állatok vasanyagcseréjének vizsgálatához szükségünk volt a plazmavas, illetve szérumvas koncentrációjának meghatározására. Erre a célra az irodalomban számos methodika található. Sajnos, a methodikák nagy részénél olyan sok plazmára van szükség (2–5 ml), hogy kis állatok — egerek, patkányok — esetében nem alkalmazhatók.<sup>1, 2</sup> De még nagyobb állatoktól sem vehetünk le rendszeresen 5–10 ml vért, ha el akarjuk kerülni, hogy magával a vérvétellel befolyásoljuk a vasanyagcserét.

A plazmavas meghatározására szolgáló methodikák más részénél elengedhetetlen, hogy a plazma vagy szérum még nyomokban se tartalmazzon haemoglobint.<sup>3</sup> Ugyanis a fehérjementesítést roncsolással végzik, és ilyenkor a haemoglobin-vas is felszabadul. Ennek következtében a plazmavas koncentrációra hamis, túlságosan magas értékeket kapunk. Márpedig egyes állatfajtáktól szinte lehetetlen haemolysimentesen vért venni, különösen nagy dózisu besugárzás után.

Más módszerekhez a reagens beszerzése ütközik nehézségekbe, vagy az eljárás túlságosan bonyolult és hosszadalmas, ezért sorozatvizsgálatokra nem alkalmazható.<sup>4</sup> Kénytelenek voltunk tehát olyan eljárást kidolgozni, amelyhez aránylag kevés plazma szükséges, egyszerűen végrehajtható és az esetleges haemolysis nem zavar.

A vasat ferro- vagy ferri-formában lehet meghatározni thiocyanáttal, di- vagy tripyridyellel, phenantrolinnal, illetve ennek különböző származékaival képzett színreakció segítségével. Eljárásunkhoz *Natelson* methodikáját vettük alapul,<sup>5</sup> annak jelentős módosításával dolgoztuk ki módszerünket a plazmavas meghatározására.

### 1. A meghatározás alapelve:

A plazmavas, illetve szérumvas leválasztását a fehérjéről savanyítással végezzük. A transferrin-vas komplex disszociációja már pH 6-nál elkezdődik és pH 4,5–5 között teljesen végbemegy.<sup>6</sup> A vasat nem tartalmazó fehérje kevésbé oldható, könnyen precipitál.<sup>7</sup> A savanyítást eleinte külön elvégeztük sósavval, majd a fehérjét trichloreccsavval (TCA) csaptuk ki, ahogy azt *Heilmeyer és mtsa* ajánlják.<sup>8</sup> Később kiderült, hogy a savanyítás és a fehérje lecsapása egy lépésben is végezhető, magával a TCA-val. Miután irodalmi utalás van arra, hogy a képződő csapadék több-kevesebb vasat vihet magával, a fehérje-precipitátumot mégegyszer átmoszuk.

A színreakció kiváltásához kálium-thiocyanátot használunk (KSCN). Ez a vegyület savanyú közegben ferri-ionokkal vörös színű ferrithiocyanátot képez:  $\text{Fe}[\text{Fe}(\text{CNS})_6]$ . A ferro-ionokat tehát előzetesen fel kell oxidálni. Erre kálium-perszulfátot használunk ( $\text{K}_2\text{SO}_5$ ).

A színreakciót egyéb kationok (Cu, Co, Mg, Ca, stb.) és bizonyos anionok ( $\text{Co}_3$ ,  $\text{SO}_4$ ,  $\text{PO}_4$ , stb.) jelenléte zavarhatja. Ilyenkor az oldat zavaros, opaleszkál. Ennek elkerülése érdekében a képződő vaskomplexet nem a vizes oldatban határozzuk meg, hanem amlalkohollal extraháljuk, aminek még az is előnye, hogy ilyen módon a vas tetszőlegesen bekonzentrálható.

Azonos térfogatok esetén a szín intenzitása arányos az oldat illetve a plazma vaskoncentrációjával. A színintenzitást kolorimeterrel mérjük.

## 2. Reagensok:

a) *Vas-törzsoldat*: 0,351 g p. a. Mohr-sót (ferroammoniumsulfát —  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot \text{FeSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) — kb. 10 ml. bidesztillált vízben oldunk. Hozzáadunk 0,2 ml. cc. kénsavat és 10 ml. telített káliumpersulfát-oldatot, majd 100 ml-re töltjük fel ugyancsak bidesztillált vízzel. Ez a törzsoldat 50 mg  $\%$  vasat tartalmaz és szobahőn stabil.

A standard oldatot ebből a törzsoldatból esetenként hígítjuk 1 : 500 arányban. Így a hígított standard oldat 100  $\mu\text{g}$   $\%$ -os.

b) *Káliumthiocyanát*: 146 g  $\text{KSCN}$ -t oldunk 100—150 ml bidesztillált vízben. Teljes feloldás után hozzáadunk 20 ml acetont, majd kiegészítjük 500 ml-re. Az oldat 29,2 $\%$ -os, jégszekrényben tartandó.

c) *Trichlorececsav*: 20 $\%$ -os p. a.

d) *Káliumpersulfát telített oldata*: 16 g  $\text{K}_2\text{SO}_5$ -ot számítunk 200 ml vízre. Alapos összerázás után ülepítjük, majd a szupernatánst használjuk. Szobahőn stabil.

e) *n-Amylalkohol* p. a.

## 3. A meghatározás menete:

Centrifugacsőben 0,5 ml plazmát vagy szérumot 2,5 ml bidesztillált vízzel 3 ml-re hígítunk. Hozzáadunk 1 ml 20 $\%$ -os TCA-t. Üvegbottal alaposan elkeverjük, 5—10 percig szobahőn állni hagyjuk, majd 10—15 percig 90—95 C° hőmérsékletű vízfürdőben melegítjük. Ilyenkor túros csapadék képződik, amit 1500—2000 rpm-mel lecentrifugálunk. A szupernatánst átöntjük egy másik centrifugacsőbe. A csapadékot 1 ml bidesztillált víz és 0,5 ml 20 $\%$ -os TCA hozzáadása után mégegyszer feltörjük üvegbottal, alaposan összerázzuk és 10 percig ismét 90 C°-os vízfürdőbe helyezük, majd lecentrifugáljuk. Felülúszóját az előző centrifugálásnál kapott felülúszóhoz öntjük. Az egyesített szupernatánshoz 0,5 ml telített K-persulfátot és 1 ml K-thiocyanát-oldatot adunk a színreakció kiváltása céljából, majd 4 ml amylalkohollal kirázzuk és lecentrifugáljuk. A felül elhelyezkedő amylalkoholos fázisból 3 ml-t kémcsőbe pipetázunk. Ezután a kirázást újabb 3 ml amylalkohollal megismételjük és a két amylalkoholos frakciót összekeverjük.

Mindenegyik meghatározáshoz standard sorozatot készítünk. A 100  $\mu\text{g}$   $\%$ -os standard oldatból 5 centrifugacsőbe 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; illetve 2,5 ml-t mérünk be és bidesztillált vízzel kiegészítjük 3 ml-re.

Vakpróba készítéséhez a plazma, illetve a standard oldat helyett bidesztillált vizet használunk. Mind a standard sorozathoz, mind a vakhoz azonos mennyiségekben adjuk hozzá a reagenseket, a fentebb ismertetett eljárás szerint.

A képződő ferrithiocyanát színintenzitását kétfényeleemes, Haveman-féle MGF-kolorimeterrel mérjük  $495 \pm 6 \text{ m}\mu$  hullámhossznál, speciális 5 cm rétegvastagságú kisküvetében.

## 4. A vaskoncentráció kiszámítása:

A standard sorozattal kapott skálaértékek 100, 200, 300, 400 és 500  $\mu\text{g}$   $\%$ -os vaskoncentrációnak felelnek meg. Ennek alapján a kapott görbe, vagy a 100  $\mu\text{g}$   $\%$ -os vaskoncentrációnak megfelelő átlag segítségével számíthatjuk ki az ismeretlen oldat vaskoncentrációját.

A standard sorozat egyes tagjaival, kis szórással, közel azonos skálaértékeket kaptunk (l. 1. sz. táblázat). Az egyes koncentrációknak megfelelő skálaértékek átlagának hibája  $\pm 3$ —5 skálaérték között mozog (azaz  $\pm 1$ —2,5 $\%$ ) minden esetben több mint 80 meghatározás alapján. A skálaértékek átlaga egy egyenesen helyezkedik el, tehát a görbe lefutása jól követi a Lambert—Beer törvényt (lásd ábra).

Az eljárás megbízhatóságát plazmához adott ismert mennyiségű *vas viszszanyerésével* ellenőriztük. Először meghatároztuk a plazmavas koncentrációját, majd a plazmavas és az ismert mennyiségben hozzáadott vas együttes koncent-

## Standard sorozattal kapott skálaértékek.

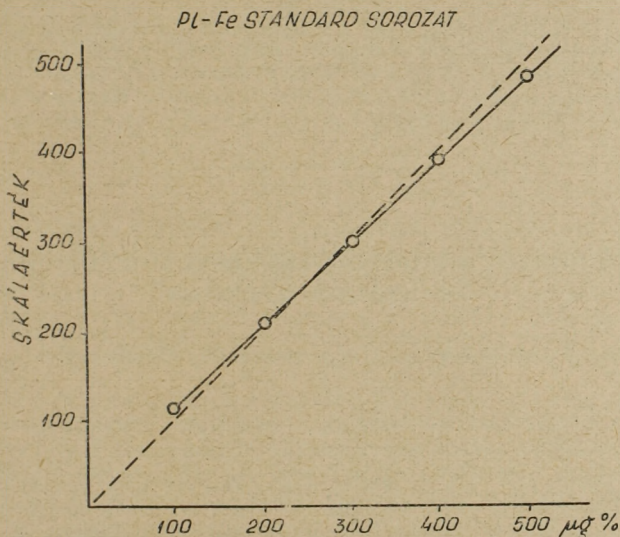
	160 $\mu\text{g } \%$	200 $\mu\text{g } \%$	300 $\mu\text{g } \%$	400 $\mu\text{g } \%$	500 $\mu\text{g } \%$
Leolvasott skála- értékek átlaga	112 $\pm 2,94$	208 $\pm 2,94$	303 $\pm 3,70$	392 $\pm 4,42$	481 $\pm 4,81$
Meghatározások száma	85	86	90	88	83

## Plazmához adott vas visszanyerése.

Plazma-vas $\mu\text{g } \%$	Hozzáadott vas $\mu\text{g } \%$	Összes vas $\mu\text{g } \%$	Talált vas $\mu\text{g } \%$	%-os vissza- nyerés
133	100	233	226	96,0
133	100	233	232	99,5
172	100	272	258	95,0
172	100	272	261	96,0
172	100	272	261	96,0
172	100	272	261	96,0
				96,0
				átl. 96,4
193	200	393	382	97,0
193	200	393	377	95,7
133	200	333	322	96,7
133	200	333	326	98,0
133	200	333	322	96,7
133	200	333	318	95,5
				95,5
				átl. 96,6
133	300	433	417	96,7
133	300	433	422	97,5
140	300	440	415	94,5
140	300	440	412	94,0
140	300	440	412	94,0
140	300	440	412	94,0
				94,0
				átl. 95,1
133	400	533	508	95,5
133	400	533	508	95,5
133	400	533	515	96,7
133	400	533	515	96,7
140	400	540	502	93,0
140	400	540	504	93,2
				93,2
				átl. 95,1

rációját. Ebből kiszámítottuk a hozzáadott vas  $\%$ -os visszanyerését. A 2. sz. táblázatban négyféle koncentrációban hozzáadott vassal elvégzett 6–6 meghatározás eredményeit láthatjuk. Az átlagos visszanyerés minden esetben 95% felett volt.

A vas visszanyerésében mutatkozó minimális (3,5–5,0%-os) eltérés annak tulajdonítható, hogy a hozzáadott amyalkoholt nem szívjuk le teljesen az esetleges zavarosodás elkerülése érdekében, másrészt annak, hogy a vas kis mennyisége a precipitátumban még így is visszamaradhat. A sorozatban elvégzett, nagyszámú meghatározás azonban azt mutatja, hogy a módszerrel kapott értékek jól reprodukálhatók.



1. ábra. Plasmavas-meghatározáshoz készített standard-sorozat koncentrációja és a megfelelő skálaértékek. Pontozott vonal 1:1 összefüggésnek felel meg.

#### Összefoglalás:

Egyszerű eljárást dolgoztunk ki a plazmavas meghatározására. Előnye, hogy kis mennyiségű plazmából végrehajtható, a haemoglobin jelenléte nem zavarja, gyors, és a szükséges vegyszerek könnyen beszerezhetők. A módszer mind klinikai laboratórium, mind állatkísérletek céljaira jól alkalmazható.

#### IRODALOM:

1. Kitzes G., C. A. Elvehjem a. N. A. Schuette: J. Biol. Chem., 155: 653, 1944. —
2. Ramsay W. N. M.: Biochem J. 53: 227., 1953. — 3. Natelson S. a. C. M. Menning: Clin. Chem., 1: 165, 1955. — 4. Peterson R. E.: Anal. Chem., 25: 1337, 1953. — 5. Natelson S.: Microtechniques of Clinical Chemistry for the Routin Laboratory. Charles C. Thomas Publ. Springfield—Ill. 1957, pp. 234–237. — 6. Surgenor D. M., Koehlin B. A., Strong L. E.: J. Clin. Invest., 28: 73, 1949. — 7. Koehlin B. A.: J. Am. Chem. Soc., 74: 2649, 1952. — 8. Heilmeyer L. u. K. Plötzner: Das Serumeisen und die Eisenmangelkrankheit. Jena, Fischer, 1937.

Э. Манди и майор м/сл д-р Л. Станик:

## ПРОСТАЯ МЕТОДИКА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЖЕЛЕЗА В ПЛАЗМЕ

Разработалась простая методика для определения железа в сыворотке. Преимуществом методики является, что не требуется большое количество плазмы, наличие гемоглобина не имеет неблагоприятное влияние, метод быстро проводимый и необходимые химические средства легко приобретаемы. Методика отлично применяется как в клинической лаборатории так и для целей экспериментов на животных.

Frau Erika Mándi, Dr. L. Sztanyik, Major d. Med. D.:

### EINFACHE BESTIMMUNGSMETHODE FÜR PLASMAEISEN

Es wurde ein einfaches Verfahren zur Bestimmung des Plasmaeisens ausgearbeitet. Dessen Vorteile sind: geringer Plasmabedarf, durch Zumischung von Hämoglobin wird es nicht gestört, es ist ein schnelles Verfahren, schliesslich sind die nötigen Chemikalien leicht zu erwerben. Die Methode ist zu klinischen Laborzwecken sowie zu Tierversuchen gleichsam geeignet.

## Változások a transport-vas koncentrációjában besugárzott állatokon\*

Írta: Sztanyik László dr. orvosőrnagy és Mándi Erika

Azokat a morfológiai károsodásokat, amelyek ionizáló sugárzás hatására az állati szervezetben fellépnek, az esetek többségében jelentős funkcionális elváltozások előzik meg. Nemcsak az egyes szervek működése szenved zavart, hanem az egész szervezet anyagcsere-folyamatai is. Egyaránt károsodhat a fehérje-, nukleinsav-, szénhidrát-, zsír- és ásványi-anyagcsere. Az anyagcsere-zavarok között különösen érdekesek számunkra a vasanyagcsere elváltozásai, minthogy utóbbi szorosan összefügg a haemopoésissal. Erről pedig közismert, hogy a szervezet egyik legsugárérzékenyebb funkciója.

A vasanyagcsere sugárzás hatására bekövetkező változásaival éppen ezért az utóbbi években sokat foglalkoztak. Közlemények jelentek meg a plazmavas koncentrációjának besugárzás utáni változásairól is. Az adatok azonban nem egyértelműek, igen gyakran ellentmondanak egymásnak. A. Chanutin és S. Ludewig pl. már 10 r dózisu besugárzás hatására és 24 órán belül a plazmavas-koncentráció emelkedését észlelték patkányoknál (1). Ezzel szemben E. C. Girvin és J. K. Hampton Jr. kísérletében alig változott a plazmavas mennyisége 50—450 r dózisu besugárzás után (2). Sőt, G. S. Melville Jr. és mtsai bifázisú hyperferraemiát írtak le, amelyet ugyancsak patkányoknál figyeltek meg 75—225 r dózisu sugárbehatás következtében (3). Igaz, hogy eredményeik gondosabb analízise — Z. M. Bacq és P. Alexander szerint is inkább a plazmavas csökkenésére mutat (4).

A szerzők más része csak lethális dózisonál észlelt értékelhető elváltozást a plazmavas mennyiségében. Szamaraknál csak 350—500 r körüli küszöbdózisok felett, nyulaknál pedig 800 r-tól. A lethális dózissal besugárzott nyulaknál T. J. Haley és mtsai kezdeti csökkenést, majd ezt követően emelkedést találtak

\* Az V. Honvédorvosi Tudományos Értekezleten elhangzott előadás alapján