

Sugárvédő vegyületek hatása az *in vitro* véralvadásra

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

Technikai munkatárs: Gázsó Margit

Sztanyik és Geszti (1) beszámoltak arról, hogy ismert sugárvédő vegyületek: Cisztein, MEA, AET és APT a citrátos nyúlplazma rekalcifikálási és thrombinos alvasztási idejét elnyújtják. Szükségesnek látszott a vizsgálatok kiterjesztése 1 és 20 mM végkoncentráción belül. Szükségesnek tartottuk azt is, hogy a vizsgálati módszerek számát emeljük és ezzel esetleg közelebb jussunk a támadáspont megállapításához.

Kísérleti módszerek:

1. A kísérletekhez 2—3 kg súlyú vegyestörzsű nyulakból frissen levett oxalátos vért használtunk. Irodalmi adatok szerint az oxalát a prothrombin rendszer szempontjából alkalmasabb alvadásgátló, mint a citrát.

A levett vért 3000 fsz.-mal 15 percig centrifugáltuk, majd a plazmákat leszíva 1:1 arányban hígítottuk. A hígító folyadékkal vittük be 2,5, 10, 20, és 40 mM-os koncentrációban a vizsgálandó vegyületeket. Az alvadás vizsgálatokat az oldószer hozzáadása után azonnal (kb. 3 sec.) 4—4 állat plazmájával ill. savójával végeztük.

2. Hígító folyadékként deszt. vizet (a cisztein esetében karbonát pufferrel pH-7,3 állítva be), pH-7,2-es foszfát- és pH-7,35-ös Owren-féle veronál puffert használtunk. A vizsgálatokat a következő szabvány módszerekkel végeztük el. (2):

- a) Thrombinos alvasztás.
- b) Toluidinkék idő.
- c) Rekalcifikálási idő.
- d) Egyfázisú prothrombin idő.
- e) Thrombininaktiválás.

A rekalcifikáláshoz 0,55%-os CaCl_2 oldatot, a prothrombin-idő meghatározáshoz marhatüdő thromboplastint használtunk fel.

3. KETI thrombinoldat kb. 10 és 20 sec. alvasztásra beállítva.
4. Holland Vöröskereszt liofil fibrinogénjéből készített 0,8 g%-os oldat.
5. Az Egyesült Gyógyszer által gyártott heparin.

Kísérleti eredmények

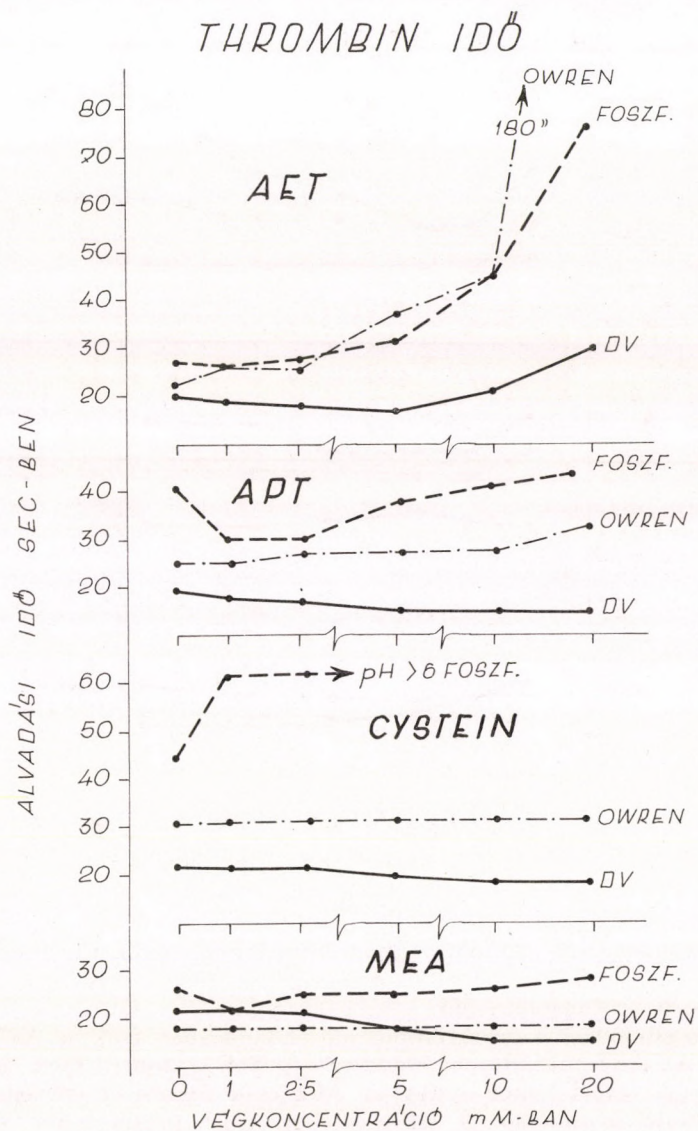
1. Thrombinidő.

Az alkalmazott oldószertől függetlenül a MEA nem változtatja meg a kontrollhoz viszonyítva lényegesebben a thrombinidőt. Cisztein esetében az alvadás csak a foszfátpufferben okoz elnyúlást (1—10 mM), feltételezhetően ebben a pH-változás is szerepet játszik. Oldószertől függetlenül az AET a kon-

centráció növelése arányában hosszabbodó alvadási időt okoz, míg APT esetében az alvadási idő meghosszabbodás csak 20 mM-os végkoncentrációban és foszfát, illetőleg Owren pufferelt oldatban jelentkezik. A deszt. vízben oldott APT a thrombinidőt kissé rövidíti.

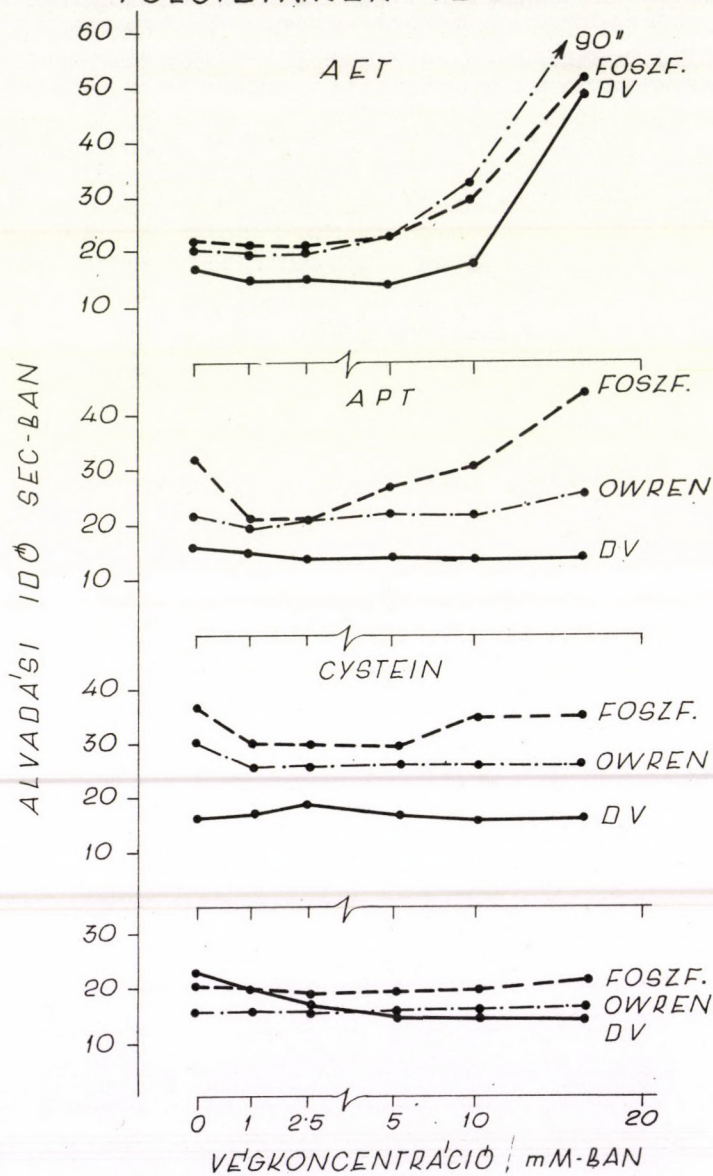
2. Toluidinkék idő.

Oldószertől függetlenül nem változik meg a toluidinkék jelenlétében végzett thrombinos alvasztás ideje MEA és Cisztein esetében. Az APT deszt. vizes, illetőleg Owren pufferelt oldatában változatlan időértékeket ad, foszfát pufferelt formában 1 és 2,5 mM koncentrációban gyorsítja, 20 mM koncentrációban elnyújtja a toulidinkék időt. Az AET oldószertől függetlenül 1—5 mM koncent-



1. sz. ábra

TOLUIDINKÉK IDŐ.



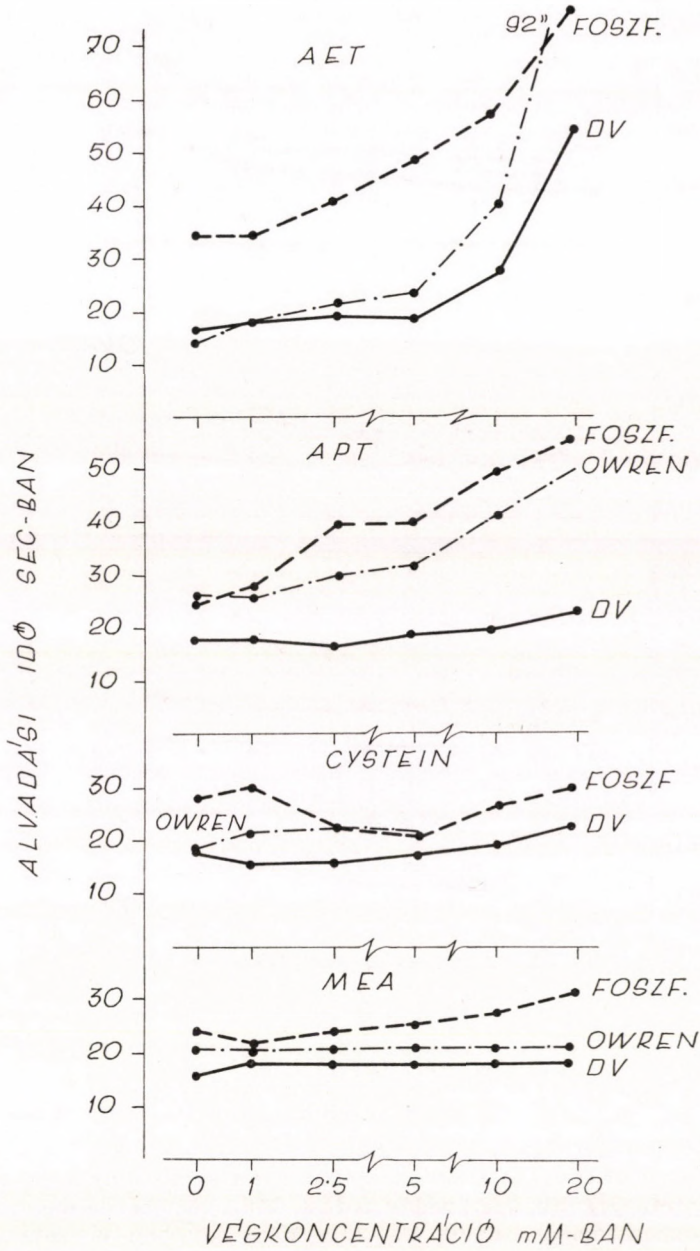
2. sz. ábra

rációban nem hatásos, 10–20 mM végkoncentrációban azonban igen erős gátlást fejt ki.

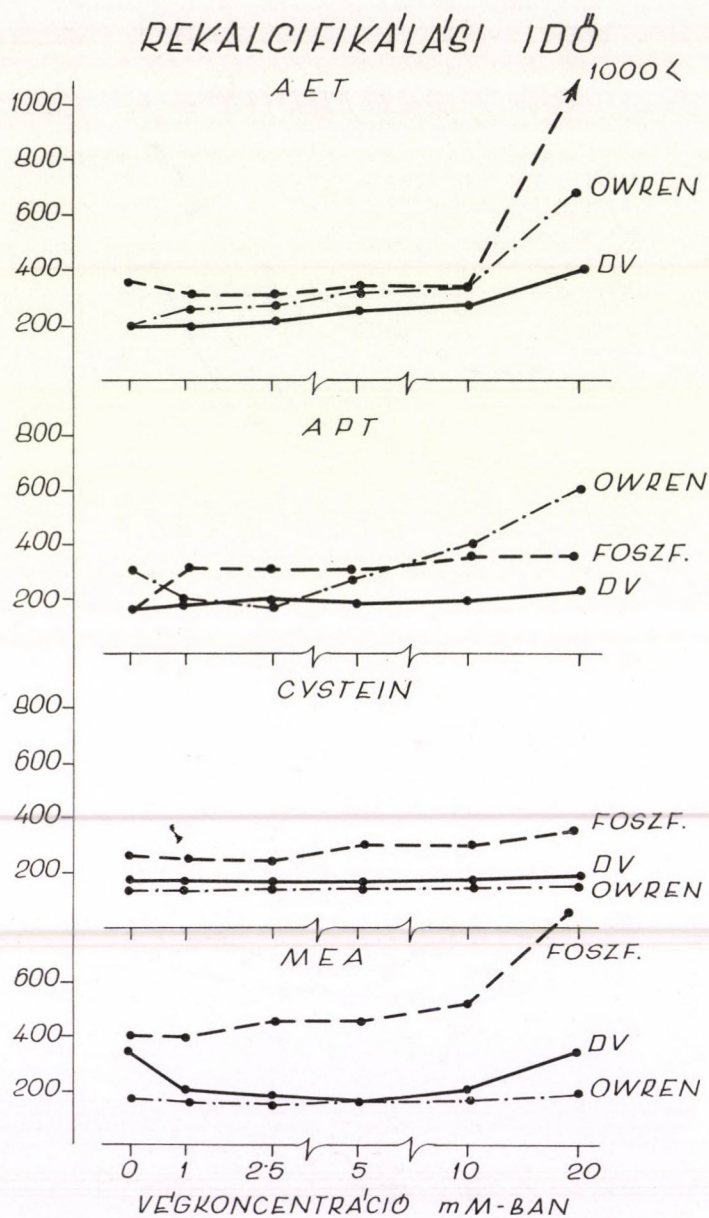
3. Egyfázisú prothrombin idő:

Lényeges eltolódást a prothrombin idő alakulásában csak az AET és APT eredményez. Az AET mindhárom oldószer esetében a koncentráció emelésével arányosan nyúló időértékeket mutat, az APT csak foszfát és Owren pufferelt oldatában gátolja az alvadást. A MEA és cisztein a prothrombin időt nem befolyásolja.

PROTHROMBIN



3. sz. ábra



4. sz. ábra

4. Rekalcifikálási idő:

0,55 g⁰/₀-os CaCl₂-vel végzett rekalcifikálási vizsgálatainkban a MEA, AET és APT mutatott szignifikans alvadás gátlást. MEA esetében a deszt. vizes oldat 5 mM végkoncentrációig rövidít, 10–20 mM-os oldatban visszatér a kontroll szintre. Owren pufferelt oldatban a MEA hatástalan, foszfát pufferben oldva a koncentráció növelésének arányában nyújtja ill. gátolja a rekalcifikált plazma alvadását. A Cisztsein „deszt. vízben” (1,5 ml pH-9 karbonát puffer + 8,5 ml deszt. vizes cisztsein oldat) és Owren pufferben adva a rendszerhez nem változ-

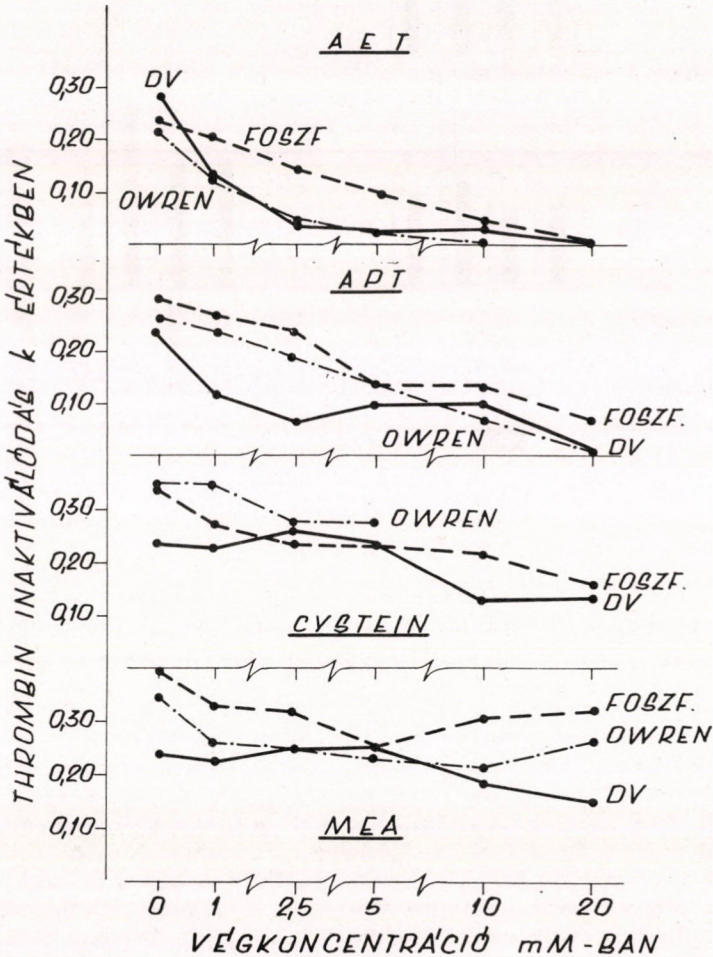
tat a rekalcifikálás idején, foszfát pufferelt oldata csak 20 mM végkoncentrációban eredményez értékelhető elnyúlást.

Az APT deszt. vizes oldatban hatástalan, foszfát pufferben juttatva a rendszerbe koncentráció növekedésével párhuzamos időelnyúlást eredményez. A gátló hatás Owren pufferben oldva 10 és 20 mM végkoncentrációkban jelentkezik, alacsonyabb koncentrációkban gyorsító hatást mutat. Az AET mindhárom oldószertebe bevive 20 mM végkoncentrációban erősen szignifikáns elnyúlást eredményez.

5. Thrombin inaktiválás:

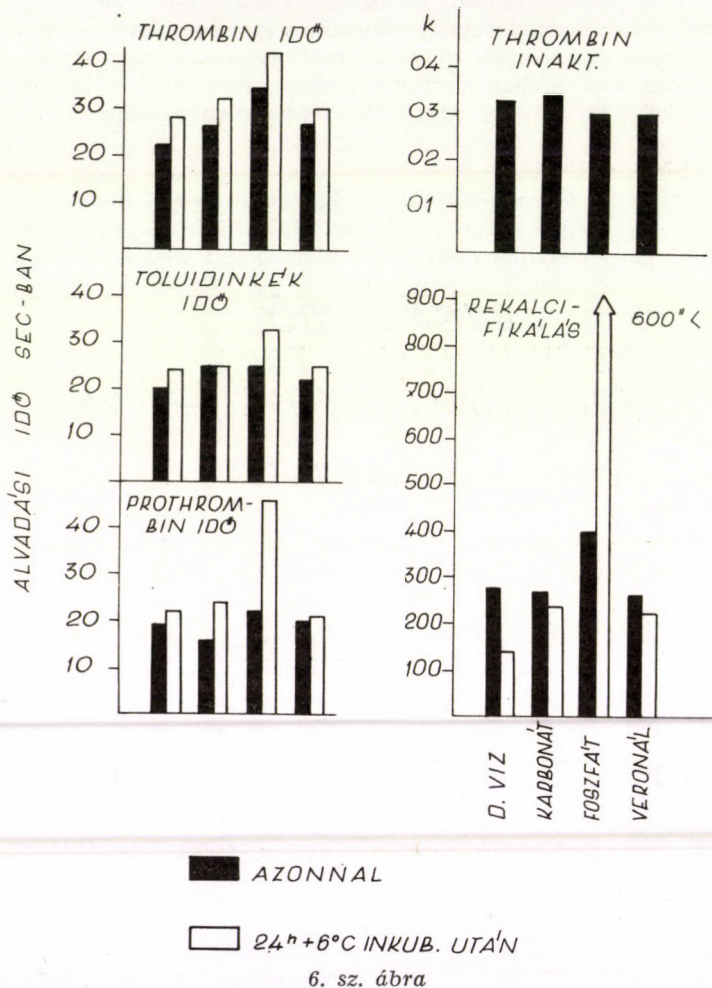
Kísérleteinkban a Gerendás által kidolgozott módszert használtuk fel. A sugárvédő vegyületek végkoncentrációját az inkubációs elegyre állítottuk be. Mind a négy vizsgált vegyület oldószertől függetlenül lassítja a thrombin inakti-

SUGÁRVÉDŐ VEGYÜLETEK HATÁSA A THROMBIN INAKTIVÁLÓDÁSRA.



5. sz. ábra

HIGÍTŐ PUFFEREK HATÁSA AZ ALVADÁSI IDŐKRE.



6. sz. ábra

válódását, a legerősebb inaktíválódási — tehát a thrombin hatásosságát megtartó — képességgel az AET ill. az APT rendelkezik. A kísérleti eredmények arra mutatnak, hogy az AET, APT-nek antiheparin hatással is kell rendelkeznie.

6. Deszt. víz, karbonát, + deszt. víz, foszfát és Owren puffer hatása a normál nyúlplazma alvadási idejére és a thrombin inaktíválásra:

Az eddig ismertetett kísérleti eredmények szükségszerűvé tették, hogy az oldószer kérdésével is foglalkozzunk. Klinikai gyakorlatban a test-plazma hígítására deszt. vizet szoktak használni. Sztanyik és Geszti (1) alapközleményükben csak foszfát puffert használtak, mi szükségesnek tartottuk, hogy a hatásosságot az alvadási gyakorlatban használt Owren pufferes oldatban is megvizsgáljuk ill. megnézzük, hogy a használt hígító szereknek a normál nyúlplazma alvadóképességére milyen hatásuk van. Vizsgálatainkat a 6. sz. ábrában foglaltuk össze, s az alábbiakban kívánjuk ismertetni.

a) Thrombin idő: A deszt. vizes hígításhoz viszonyítva mindhárom hígító szer időelnyúlást eredményez, a foszfát puffer gátlóhatását jelentősnek kellett tartanunk. A plazma alvadási ideje 24 óra + 6 C°-on történő tárolása után tovább nyúlik.

b) Toluidinkék idő: A különböző hígító pufferek kisfokú nyúlást eredményeznek, ez a hatás azonban stabil, csak a foszfát pufferrel hígított plazma tol. kék ideje nyúlik tovább a tárolás hatására.

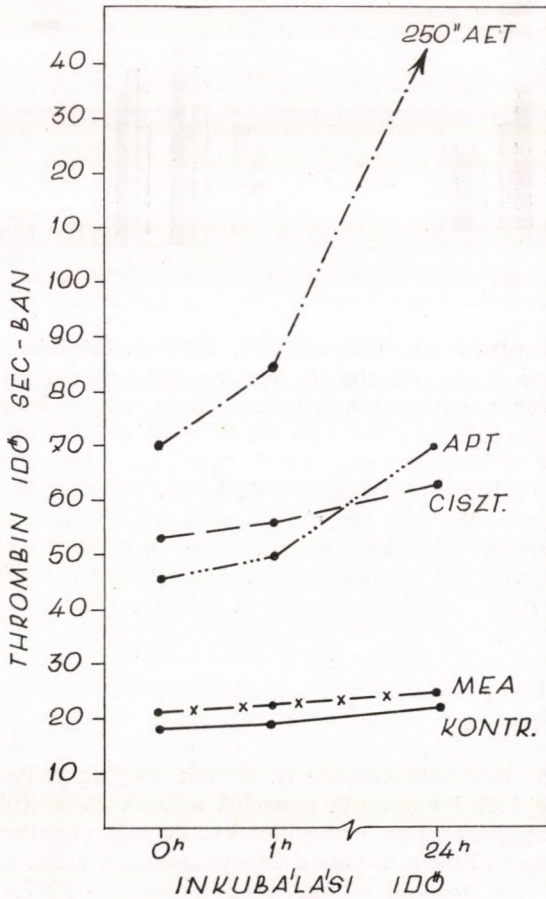
c) Prothrombin idő: A különböző hígító pufferek kisfokú elnyúlást eredményeznek, a deszt. víz + carbonat rövidíti az alvadást. Szignifikánsná válik a prothrombin idő gátlása a foszfát pufferrel plazma 24 órás tárolása után.

d. Rekalcifikálási idő. Rekalcifikálási testben csak a foszfát puffer mutat alvadási idő nyújtó hatást, ez 24 óra tárolás után tovább nyúlik. A többi hígító puffer esetében kisfokú fokozódás észlelhető.

e) Thrombin inaktiválás: A savó inaktiváló képességét a hígító pufferek nem befolyásolják.

7. Vizsgálatok humán fibrinogen oldattal:

FIBRINOGEN OLDAT THROMBIN IDEJÉNEK VÁLTOZÁSA INKUBÁLÁS HATÁSÁRA.

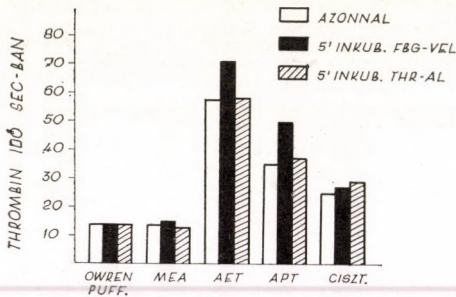


7. sz. ábra

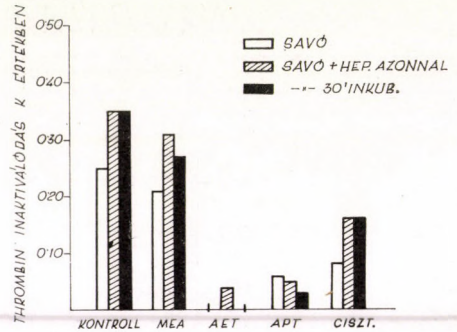
A véralvadást a fibrinogen fibrinné való átalakulása fejezi be. Amennyiben a vizsgált vegyületek egyik hipotetikus támadáspontja a fibrinogen, úgy tiszta rendszerben — fibrinogen oldat thrombinos alvasztásában — is jelentkeznie kell az átalakulás gátlásának ill. inkubálás esetén a gátlóhatás erősödésének. A vizsgálatokat a Holland Vérellátó Szolgálat therapiás célokra készített humán fibrinogénjének foszfát ill. Owren pufferelt 0,8 g⁰/₀-os oldatával végeztük. Miután szignifikáns gátlást nyúlplazmán csak 20 mM végkoncentrációnál kaptunk a vizsgált vegyületeket 20 mM végkoncentrációban adtuk a fibrinogen oldathoz. Thrombinos alvasztást végeztünk a hozzáadás után azonnal (3 sec.), 1 és 24 óra inkubáció után (7. sz. ábra).

Mint az ábrából is látható, a foszfát pufferrel készített fibrinogen oldat alvasztási ideje az inkubáció alatt nem változik. Ugyancsak nincs lényegesebb változás a MEA-val történő inkubálás során sem.

FIBRINOGENNEL ÉS THROMBINNAL TÖRTÉNŐ 5' INKUBÁLÁS HATÁSA A THROMBIN IDŐRE.



BUGÁRVÉDŐ VEGYÜLETEK „ANTIHEPARIN” HATÁSA.



Lényeges eltérést kaptunk azonban az AET, APT és Cisztein esetében. Az ún. azonnali vizsgálat kb. 3 sec. inkubációt jelent a thrombin oldat hozzáadása előtt és ez idő elég volt a gátlóhatás kialakulásához, amely különösen AET esetében több 100% megnyúlást eredményezett az inkubáció során. A vizsgálatok igazolják, hogy az alkalmazott vegyületek egyik támadáspontja a fibrinogen, de nem zárják ki a thrombinra gyakorolt hatás lehetőségét, ezért inkubációs kísérleteket végeztünk, úgy, hogy a 20 mM végkoncentrációt előbb a fibrinogen, majd a thrombin oldatban hoztuk létre és 5 perc inkubáció után thrombint ill. fibrinogent adtunk a rendszerhez. A fibrinogennel inkubált rendszer alvasztása AET és APT esetében jelentősen eltér a thrombinnal inkubált rendszer alvaszthatóságától.

8. Az „antiheparin” hatás vizsgálata:

Mint már az előzőekben közöltük az AET, APT és cisztein csökkentik a savó thrombin inaktiváló képességét, elősegítik a thrombin existenciáját. A heparin antithrombin szerepe régóta ismert, és ismert Gerendás vizsgálatai alapján a thrombin inaktiválásban betöltött szerepe is. Ennek alapján normál nyúlsavó 0,6 ml-hez (savó puffer 1:1) 1,5 gamma heparint adtunk és néztük az inaktiválódás változását. A vizsgálatokhoz a vegyületeket 20 mM végkoncentrációban foszfát pufferelt oldatban adtuk a savóhoz. Meghatároztuk a thrombin inaktiválódását a hozzáadás után azonnal és úgy, hogy a savó — puffer — heparin rendszert a thrombin hozzáadása előtt 30 percig inkubáltuk.

A savó inaktiváló képességét a vegyületek csökkentették. A heparinnal kis fokban fokozott inaktiválást különösen az AET és APT gátolja. Az inkubálás ezt a hatást fokozta és az AET esetében az inaktiválási folyamat teljes felfüggesztését, APT esetében pedig erős gátlását váltotta ki.

Előkísérleteink szerint a heparin okozta toudinkék metakromazia AET-vel felfüggeszthető, tehát direkt antiheparin hatás is kimutatható.

A kísérleti eredmények megbeszélése

Kísérleteink megerősítik Sztanyik és Geszti (1) rekalcifikálási és thrombinos alvasztási vizsgálatokkal kapott eredményét.

A közölt adatok szerint elsősorban a potenciális SH-vegyületek rendelkeznek alvadásgátló hatással. A gátlás általában 10—20 mM végkoncentrációknál jelentkezik. Az SH tartalmú vegyületek esetében jelentkező kisfokú alvadásgátlást nagyon nehéz elkülöníteni az alkalmazott hígító-puffer hatásától, vizsgálataink szerint ugyanis a hígító-pufferek — különösen a foszfát puffer — önmagukban is nyújtják az alvadás idejét. Owren-féle veronal pufferben az SH tartalmú vegyületek gátlóhatása kisebb, mint foszfát pufferben. A potenciális SH-vegyületek hatásosságát a puffermedium összetétele kevésbé befolyásolja.

Az, hogy az AET és APT gátlóhatása az alkalmazott tesztelesek (thrombin-, tol. kék-, prothrombin-, rekalcifikálási-idő) mindegyikében jelentkezik, arra mutat, hogy zavar van mind az intrinszi mind az extrinszi thrombin aktivációban, ill. a kettős közös találkozási pontjában a fibrinogen-fibrin átalakulásban. Ez utóbbit erősíti meg az is, hogy a thrombin-idő vizsgálata esetében is alvadásgátlást lehetett tapasztalni.

Fibrinogen oldaton vizsgálva a hatást, már a vizsgálati anyag hozzáadása után azonnal (3 sec.) gátlódik a thrombinnal történő alvaszthatóság és ez a gátlás inkubációval tovább fokozható. Ezzel szemben nincs különbség az azonnali meghatározás és a thrombinnal történő 5 perces inkubálás után végzett thrombinos alvasztási idők között, ugyanez fibrinogennel történt inkubálás esetében már megnyúlást eredményez.

Ezek az adatok arra mutatnak, hogy a potenciális SH-vegyületek egyik támadáspontja a fibrinogen.

Külön kérdés az AET és APT savóban észlelhető inaktiválás gátló, „anti-heparin” hatása. Az, hogy a thrombin a vizsgálati idő 5 perce alatt aktivitását változatlanul megtartja, hogy a heparin bevitel ellenére az inaktivitás csökkenthető, ill. a heparin metakromaziás hatása tiszta rendszer esetében AET-vel felfüggeszthető, arra mutat, hogy a potenciális SH-t tartalmazó sugárvédő vegyületek kapcsolatba léphetnek a heparinnal.

A két eredménycsoport között látszólagos ellentmondás van. Ugyan azok a vegyületek a plazmában alvadásgátlást; a savóban az alvadás aktív thrombin megtartását eredményezik. Bár a plazmában van heparin a savó azonban fibrinogent nem tartalmaz, tehát olyan rendszer, ahol előtérbe léphet a heparinra gyakorolt hatás. Két különböző rendszerről van szó és az ellentétes hatás tisztázására további kísérleteket kell végezni.

Összefoglalás

1. Kísérleteink megerősítik Sztanyik és Geszti megfigyelését a sugárvédő vegyületek alvadásgátló hatásáról.
2. Kísérleteinkben a potenciális SH-vegyületek (AET, APT) thrombin-,

toluidinkék-, prothrombin-, és rekalcifikálási-időt nyújtó hatását észleltük, az SH-tartalmú vegyületek (MEA, cisztein) hatása nem egyértelmű.

3. A vegyületek bevitelére használt puffer-oldatok a deszt. vízhez viszonyítva önmagukban is kisfokú alvadásgátlást mutatnak, ez a gátlás különösen foszfát-puffer esetében és inkubálás során fokozódik.

4. Liofil humán fibrinogennel végzett vizsgálatokkal igazoltuk, hogy az AET és APT egyik támadáspontja a fibrinogen. Nem zártuk ki azonban az egyéb tényezőkre gyakorolt hatást.

5. Az AET és APT gátolják ill. erősen felfüggesztik a savó thrombin inaktíváló képességét, a heparin antithrombin hatását és a toluidinkékkal adott in vitro metakromaziát.

IRODALOM

1. *Sztanyik L.—Gesztí O.:* Honvédorvos., 3. 1964. 205. 2. *Gerendás M.:* Véralvadás és vérzéscsillapítás. Medicina, 1960.

Д-р Фиам Б., подполковник мед. службы, Гажо М.:

ДЕЙСТВИЕ РАДИОЗАЩИТНЫХ СОЕДИНЕНИЙ НА СВЕРТЫВАНИЕ В ПРОБИРКЕ

1. Наши эксперименты подтверждают наблюдение Станика и Гести о том, что радиозащитные соединения обладают противосвертывающим действием.

2. В экспериментах наблюдали, что соединения SH (AET, APT) удлиняют тромбинное, толуидинсинее, протромбиновое время и время рекальцификации. В том случае, если эти соединения не потенциальные, (MEA, цистеин), тогда их действие неоднородное.

3. Буферные растворы, которые служат для введения радиозащитных соединений, сами тоже по отношению дистиллированной воды обладают противосвертывающим действием и по отношению дистиллированной воды обладают противосвертывающим действием и это действие в случае фосфатного буфера в ходе инкубации усиливается.

4. Эксперименты, проведенные лиофилизированным человеческим фибриногеном, доказывают, что точкой приложения AET и APT является фибриноген. Нельзя исключить действие и на другие факторы.

5. AET и APT блокируют или сильно действуют на инактивационную способность тромбина сыворотки, антитромбиновое действие гепатина и метакромасию толудиновой синьки в пробирке.

Dr. B. Fiam, Oberstl. d. Med. D., Kandidat d. Med. Wissensch., Frau M. Gázsó:

WIRKUNG DER STRAHLENSCHUTZSTOFFE AUF DIE BLUTGERINNUNG

Die Versuchsergebnisse der Autoren bestätigen die Daten von *Sztanyik* und *Gesztí* im Zusammenhang mit der gerinnungshemmenden Wirkung einiger Strahlenschutzstoffe. Als Resultat der Versuche liess sich feststellen, dass die potentiellen SH-Verbindungen (AET, APT) die Thrombin-, Toluidinblau-, Prothrombin-, sowie Rekalzifizierungszeit verlängern, während die Wirkung der SH-enthaltenden Verbindungen (MEA, Cystein) nicht eindeutig ist. Die zur Einführung der Verbindungen angewandten Pufferlösungen besitzen im Vergleich zum destillierten Wasser, sogar an sich eine schwache hemmende Wirkung auf die Blutgerinnung, welche sich besonders bei Verwendung eines Phosphatpuffers und während der Inkubation erhöht. Aus den Versuchen mit menschlichem lyophilisiertem Fibrinogen geht es hervor, dass das Fibrinogen als ein Angriffspunkt des AET und APT dient. Es konnte jedoch dessen Einwirkung auf andere Faktoren nicht ausgeschlossen werden. AET und APT hemmen, bzw. dämpfen beträchtlich die thrombininaktivierende Fähigkeit des Serums, die Antithrombinwirkung des Heparins, sowie die mit Toluidinblau in vitro erzeugbare Metachromasie.