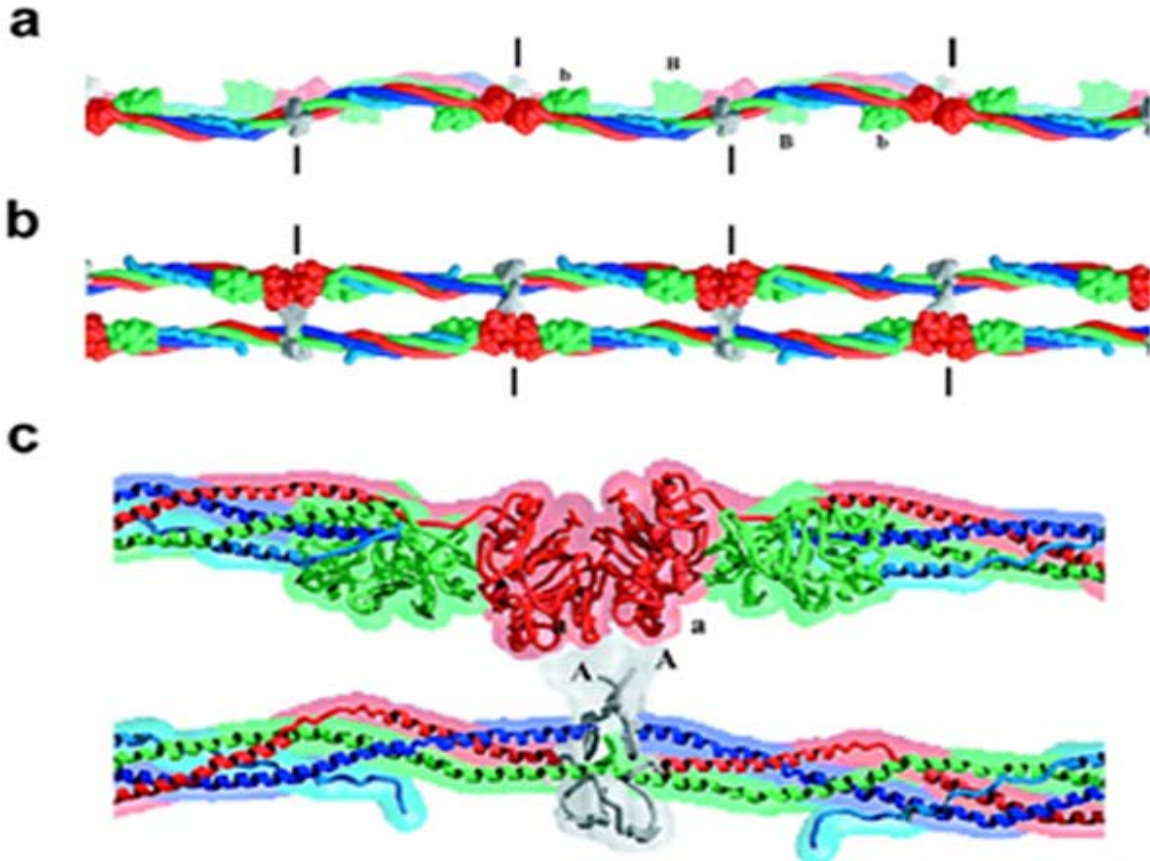


## A VÉRALVADÁS EGYES LÉPÉSEINEK MODELLEZÉSE

A véralvadás végterméke a fibrin gél, amely trombin hatására keletkezik a vérplazmában 2-4 g/l koncentrációban levő fibrinogénből. A fibrinogén 340.000 molekulásúlyú glikoprotein, amely diszulfid-hidakkal összekötött  $2A\alpha$ ,  $2B\beta$  és  $2\gamma$  polipeptidláncból áll. Az  $A\alpha$  láncról a 16 aminosavból álló N-terminális részt (fibrinopeptid A) a trombin lehasítja, és így fibrin I. monomer keletkezik. A fibrin I. monomerek (a fibrinogén molekuláktól eltérően) fiziológiás ionerősség mellett nagy affinitással egymáshoz tapadnak, aggregálódnak. Amennyiben koncentrációjuk kicsi ( $<0,1$  g/l) keletkezésük csak csökkenti a fibrinogén oldat stabilitását. E jelenséget a gyakorlat során vizsgáljuk az etanol gelációs teszttel. A módszerrel detektálhatjuk a fibrinogén oldat csökkent stabilitását alkoholos közegben. (Ezt a tesztet régebben a DIC<sup>1</sup> diagnosztikájában alkalmazták.)



**1. ábra. Fibrin polimerizáció.** A fibrin molekula térbeli modelljén (felső ábra) a polimerizációs helyek vannak feltüntetve; A és B: a fibrinopeptid A, ill. B lehasítása után hozzáférhetővé váló polimerizációs helyek, amelyek az állandóan hozzáférhető a, ill. b helyhez kötődnek.

Ha a fibrin I. monomerek koncentrációja a fent említett értéknél nagyobb, akkor azok egymás végéhez tapadnak és hosszú polimereket, protofibrileket képeznek (1. ábra.). Az utóbbiak szintén lehetnek szubsztátjai a trombinnak, amely lehasítja a  $B\beta$  láncokról a 14 aminosavból álló N-terminális részt (fibrinopeptid B), és így fibrin II. protofibrilek keletkeznek. Ez utóbbiak már nemcsak "vég a véghez", hanem "oldal az oldalhoz" is tapadnak, és így egy kiterjedt térbeli háló alakul ki, a fibrin gél. Mivel a monomerek közötti kötések nem kovalens természetűek, tömény urea oldatban a fibrin feloldódik. Fiziológias körülmények között a trombin aktiválja a plazmában levő XIII. faktort, amely N-( $\gamma$ -glutamil)- $\epsilon$ -lizin keresztkötéseket létesít a fibrinmonomerek  $\gamma$  és  $\alpha$  láncai között. A keresztkötött, kovalensen

<sup>1</sup> A DIC ("disszeminált intravaszkuláris koagulopátia") egy sor klinikai kép súlyos szövődménye, amelynek lényege aktív trombin és aktív plazmin együttes jelenléte a szisztémás keringésben és az ebből adódó trombotikus és hemorrhágiás jelenségek.

stabilizált fibrin már nem oldódik ureában. A XIII. faktor hatását a gyakorlaton glutáraldehiddel fogjuk modellezni (a glutáraldehid Schiff-bázis keresztkötéseket létesít különböző láncokon levő lizin oldalláncok között).

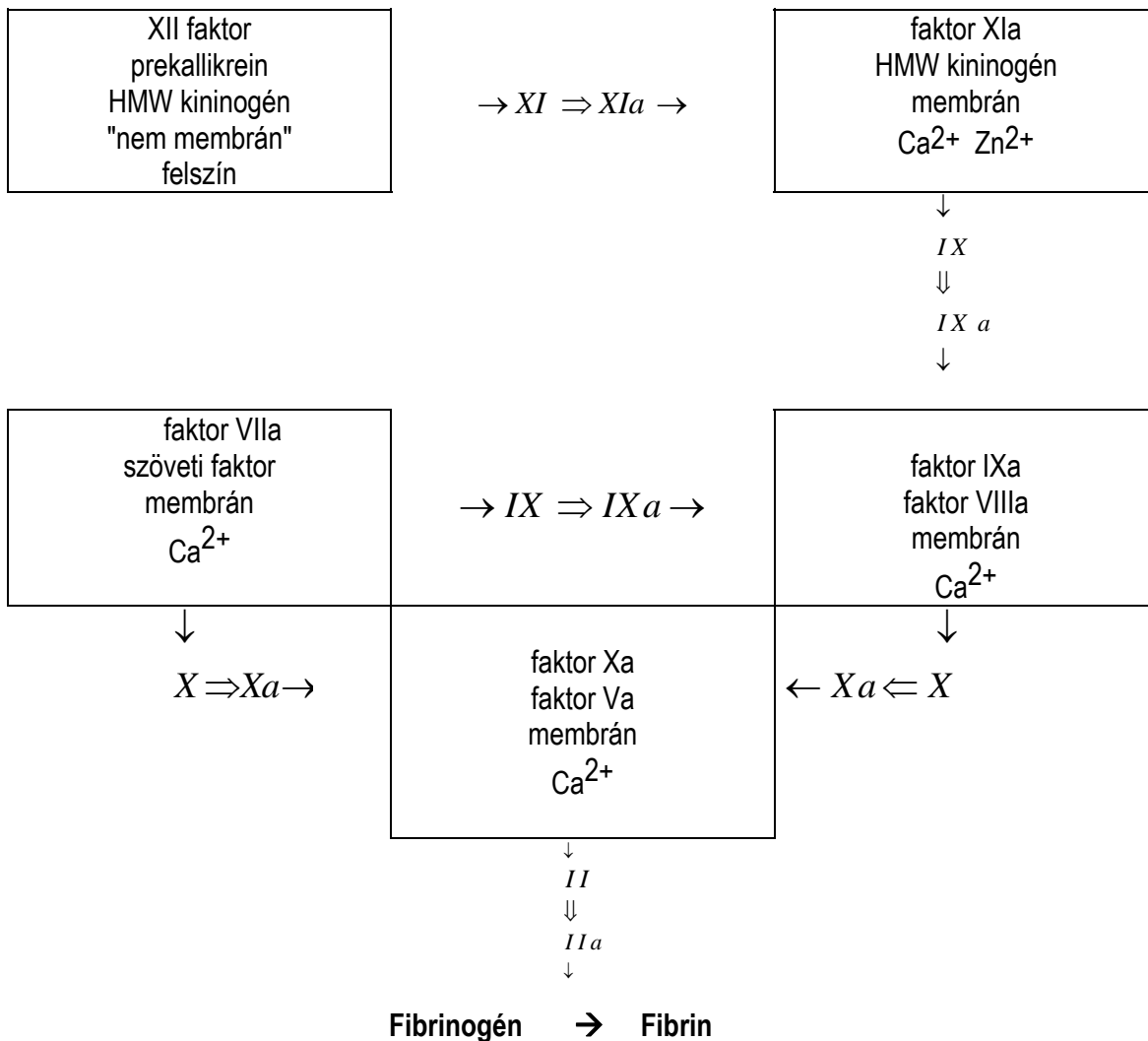
A trombin aktivitása szigorú szabályozás alatt áll. A trombin a plazmában levő protrombinból keletkezik a protrombináz komplex (Ca<sup>2+</sup> révén foszfolipid membránhoz kötött Xa és Va faktorok) hatására. Az utóbbi komplexben levő szerin proteáz (Xa) viszont csak az érpálya integritásának megsértése esetén aktiválódik a zimogénből (X faktor) két tenáz komplex hatására (2. ábra):

a) extrinzik tenáz (a vérplazmával fiziológiásan nem érintkező sejtek membránjában konstitutíve expresszált szöveti faktor és a VIIa faktor által Ca<sup>2+</sup> közvetítésével alkotott komplex);

b) intrinzik tenáz (Ca<sup>2+</sup> révén foszfolipid membránhoz kötött IXa és VIIIa faktor).

A gyakorlaton az extrinzik úton történő aktiválódást a nyúlágyból származó tromboplasztinnal (szöveti faktor és plazmamembrán) modellezzük. (Ez a klinikai gyakorlatban alkalmazott szöveti faktor indukálta alvadási idő, régebbi néven protrombin idő vizsgálata.) Az intrinzik úton történő aktiválódást kaolin felszínen fogjuk modellezni foszfolipid-membrán (parciális tromboplasztin) kiegészítéssel (ez a klinikai gyakorlatban alkalmazott felület indukálta alvadási idő, régebbi néven aktivált parciális tromboplasztin idő vizsgálata).

A trombin aktivitás szabályozásának másik módja a keletkezett trombin gátlása. A plazmában magas koncentrációban (több μM) levő inhibitorok (antitrombin, heparin-kofaktor II, α<sub>1</sub>-proteáz inhibitor, α<sub>2</sub>-makroglobulin) gyorsan inaktíválják a szabad trombint (koncentrációja 10<sup>-8</sup> M nagyságrendű). Heparin elősegíti az első két inhibitorral történő trombin inaktívációt. A gyakorlaton az antitrombin-trombin reakciót fogjuk vizsgálni.



2. ábra. A protrombin aktivációban közreműködő enzim komplexek

## 1. SZÖVETI FAKTOR INDUKÁLTA ALVADÁSI IDŐ (PROTROMBIN IDŐ)

### Szükséges anyagok és eszközök:

- 1.) citrátos normál plazma (N PI)
- 2.) K-vitamin dependens faktorokat csökkent koncentrációban tartalmazó plazma (patológiás plazma) (P PI)
- 3.) nyúlgyag tromboplasztin-0,025 M CaCl<sub>2</sub> reagens (TP)
- 4.) műanyag csövek
- 5.) behajlított végű üvegbot
- 6.) stopperóra

### Mérési módszer:

Legalább 2 percig 37°C-on inkubáljuk a tromboplasztin-CaCl<sub>2</sub> reagenst. 37°C-ra előmelegített mérőcsövekbe pipettázunk. Állítsuk össze egyesével az alábbi reakcióelegyet:

	1.cső	2.cső
normál plazma (N PI)	0,1 ml	-
patológiás plazma (P PI)	-	0,1 ml
2 percig 37°C-on inkubáljuk	+	+
előmelegített tromboplasztin- CaCl <sub>2</sub> (TP)	0,2 ml	0,2 ml
PI (s)		
PR		

A tromboplasztin- CaCl<sub>2</sub> keverék hozzáadásával indítjuk a stoppert és a hajlított végű üvegbot mozgatásával regisztráljuk az első fibrinszál megjelenéséig eltelt időt. Ez lesz a protrombin idő (PI).

Határozzuk meg a protrombin rátát ( $PR = PI_{\text{beteg}}/PI_{\text{kontroll}}$ ). A klinikai gyakorlatban ezt a tesztet használják a K-vitamin antagonistákkal történő kezelés követésére. A terápiás tartományban a  $PR=2-4,5$ .

## 2. FELÜLET INDUKÁLTA ALVADÁSI IDŐ, RÉGEBBI NÉVEN AKTIVÁLT PARCIÁLIS TROMBOPLASZTIN IDŐ (APTI)

### Szükséges anyagok és eszközök:

- 1.) parciális tromboplastin (csak foszfolipid membránt tartalmaz) és kaolin szuszpenzió keveréke (APTI reagens, APTI R)
- 2.) 0,025 M CaCl<sub>2</sub>
- 3.) citrátos normál plazma (N PI)
- 4.) hemofiliás plazma (H PI)
- 5.) 0,1 U/ml heparin tartalmú plazma (Hep PI 1)
- 6.) 0,05 U/ml heparin tartalmú plazma (Hep PI 2)
- 7.) műanyag csövek
- 8.) behajlított végű üvegbot
- 9.) stopperóra

### Mérési módszer

A 37°C-ra előmelegített mérőcsövekbe 0,1 ml alaposan felszuszpendált APTI reagenst mérünk, és legalább 2 percig 37°C-on vízfürdőben előinkubáljuk. Ezután 0,1 ml plazmát adunk hozzá, összerázzuk és újabb 2 percig 37°C-on inkubáljuk. A reakciót 0,1 ml 0,025 M 37°C-ra előmelegített CaCl<sub>2</sub>-dal indítjuk és egyidejűleg elindítjuk a stoppert is. A hajlított végű üvegbot segítségével határozzuk meg az első fibrinszál megjelenéséig szükséges időt. Ez lesz a minta APTI-je.

Állítsuk össze egyesével az alábbi reakcióelegyeket:

	1.cső	2.cső	3.cső	4.cső
előmelegített APTI reagens	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
2 perc inkubáció	+	+	+	+
normál plazma	0,1 ml	-	-	-
hemofiliás plazma	-	0,1 ml	-	-
0,1 U/ml heparinos plazma	-	-	0,1 ml	-
0,05 U/ml heparinos plazma	-	-	-	0,1 ml
2 perc inkubáció 37°C	+	+	+	+
0,025 M CaCl <sub>2</sub>	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
APTI (s)				

A klinikai gyakorlatban ezt a tesztet alkalmazzák a hemofiliák diagnosztikájában, és a heparin terápia követésére.

### 3. FIBRIN STABILIZÁCIÓ VIZSGÁLATA

#### Szükséges anyagok és eszközök:

- 1.) fibrinogén 2,5 g/l oldata 0,01 M imidazol+ 0,15 M NaCl pH 7,4 pufferben (Fg)
- 2.) 50 NIH U/ml trombin 0,01 M imidazol+ 0,15 M NaCl pH 7,4 pufferben (Th 50)
- 3.) 8 M urea oldat (urea)
- 4.) 2,5% glutáraldehid 0,01 M imidazol+ 0,15 M NaCl pH 7,4 pufferben (Glut)
- 5.) üvegcsövek

Állítsuk össze a következő reakcióelegyeket szobahőn:

	1	2
fibrinogén (Fg) (μl)	500	500
50 U/ml trombin (Th 50) (μl)	100	100
1 perc inkubáció 22 °C	+	+
glutáraldehid (Glut) (μl)	-	100

5 perc inkubáció után (szobahőn) próbáljuk feloldani a két fibrint 2 ml urea oldattal.

### 4. ETANOLGELÁCIÓS TESZT

#### Szükséges anyagok és eszközök:

- 1.) fibrin monomer oldat (Fn M)
- 2.) fibrinogén 2,5 g/l oldata 0,01 M imidazol+ 0,15 M NaCl pH 7,4 pufferben (Fg)
- 3.) etanol-borát puffer (0,15 M), pH 8,0 (EB)
- 4.) üvegcsövek

Teszt:

A mintához etanol-borát puffert adunk. Erőteljesen rázzuk össze. 1 óra szobahőn történt inkubáció után ismét rázzuk össze, és olvassuk le az eredményt:

-a teszt pozitív (csökkent fibrinogén oldékonyság), ha az oldat felszínén levő kis tömött aggregátumról nagy medúzaszerű gél lóg, amely esetleg kitölti az egész oldat térfogatát;

-a teszt negatív (normális fibrinogén oldékonyság), ha legfeljebb csak a felszínen kis aggregátum látszik.

Állítsuk össze a következő reakció elegyeket:

	1	2
fibrinogén (Fg)	1 ml	1 ml
fibrin monomer (Fn M)	-	0,1 ml
etanol-borát puffer (EB)	1,5 ml	1,5 ml

Ez a teszt az alapjelenség demonstrálása mellett durva tájékoztatást ad fibrin monomerek jelenlétéről a plazmában (pl. DIC-szindróma).

## 5. ANTITROMBIN- TROMBIN REAKCIÓ VIZSGÁLATA

### Szükséges anyagok és eszközök:

- 1.) 0,01 M imidazol 0,15 M NaCl pH 7,4 puffer (Imi)
- 2.) antitrombin oldat (AT)
- 3.) 20 NIH U/ml trombin (Th 20)
- 4.) 2,5 g/l fibrinogén 0,01 M imidazol 0,15 M NaCl pH 7,4 pufferben (Fg)
- 5.) 0,5 U/ml heparin (Hep)
- 6.) 3 db. Eppendorf-cső
- 7.) 6 db. üvegcső
- 8.) behajlított végű üvegbot
- 9.) stopperóra

### Mérési módszer:

Az antitrombin-trombin reakció során a trombin koncentrációja folyamatosan csökken. Az aktuális trombin aktivitást az alvadási idő mérésével detektáljuk: az antitrombin-trombin reakcióelegyből 1 és 7 perc elteltével 100  $\mu$ l mintát veszünk ki, hozzáadjuk 200  $\mu$ l fibrinogénhez és a hajlított végű üvegbot mozgatásával regisztráljuk az első fibrin szál megjelenéséig eltelt időt. Az antitrombin-trombin reakció indítása előtt 6 db. üvegcsőbe 200-200  $\mu$ l fibrinogént mérjünk be.

### Antitrombin-trombin reakcióelegyek:

Anyagok	1	2	3
antitrombin (AT) ( $\mu$ l)	--	110	110
heparin (Hep) ( $\mu$ l)	--	--	20
imidazol puffer (Imi) ( $\mu$ l)	130	20	--
trombin (Th 20) ( $\mu$ l)	120	120	120

A reakcióelegyeket Eppendorf-csövekben állítsuk össze; új reakciót csak akkor indítsunk, ha az előzővel az összes mérést elvégeztük. A trombin-antitrombin reakciót trombin hozzáadásával indítjuk el. Az indítástól számított 1. és 7. percben vegyünk ki 100  $\mu$ l-es mintát és alvadási időt mérünk. Ha az alvadási idő 120 s-nál hosszabb, végtelennek tekintjük.

### Eredmények:

reakcióidő	1'	7'
alvadási idő (s) 1. cső		
1/t 1. cső		
alvadási idő (s) 2. cső		
1/t 2. cső		
alvadási idő (s) 3. cső		
1/t 3. cső		

Milliméterpapíron ábrázoljuk az alvadási idő reciprok értékét a reakcióidő függvényében. Ez az érték arányos az aktív trombin koncentrációjával. Az 1. csőben mért értékek átlagát a reakció 0. perces állapotának tekintjük.