

Különlenyomat az Orvosi Hetilap 1934. évi aug 25-j, 34. számából.

A Ferencz József Tud.-Egyetem belgyógyászati klinikájának közleménye. (igazgató: Rusznyák István, ny. r. tanár.)

A vérplasma fehérjefracciónak meghatározása a Zeiss-féle stufenphotometerrel.

Irta: *Korányi András dr. és B. Hatz Ella dr.*

Míg a vérplasma chemiai összetételeinek változásai a különböző physiologiás és pathologiás körülmények között a mindinkább szaporodó mikromethodusok folytán hamar ismertekké váltak, addig a fehérjék quantitativ viszonyai az utóbbi évtizedig kevésbé tisztázódtak. Ennek okát kétségtelenül nem a fehérjereactiók minőségi viszonyainak érdektelenségében, hanem a meglévő vizsgálati eljárások megbízhatatlanságában és nehézkességében kell keresnünk.

Hammarsten gravimetriás, *Autenrieth* kolorimetriás eljárása a fenti okok miatt nem vezethetett széleskörű vizsgálatok megindítására. Jelentős lépés volt pontossága folytán *Howe* nitrogen-meghatározásokon alapuló Kjeldahl-rendszerű methodusa. Bár ez az eljárás a már említett megbízhatósága miatt általánosan elismertté lett, hosszadalmassága folytán mégsem könnyítette meg kellőleg a vérplasma fehérjefracciónak sorozatos experimentalis és klinikai meghatározásait. Annak ellenére, hogy *Kober*, *Bloor*, majd *Kleimann* sorozatos vizsgálatai bebizonyították a nephelometriás eljárások könnyedségét és széleskörű használhatóságát, a vérplasma kicsapott fehérje-zavarosodásainak nephelometer segítségével történő meghatározására csak jóval később fordult a kutatók figyelmé. Két francia szerző, *Benard* és *Laborde* végzett ugyan ezen elgondolások alapján kísérleteket, de az eljárás ismertetése nem jelent meg. Az első közölt eljárás *Rusznyáktól* származik, ki először albumin-globulin quotient, később fibrinogen és a globulinok meghatározására dolgozott ki módszert. Meghatározásait a Plesch-féle chromophometerből saját tervei szerint átalakított nephelometerrel végezte, s a fehérjék kicsapására sorozatos kísérletei eredményeként különböző telítettségű ammonium-sulfat-oldatokat talált a legalkalmasabbnak. *Rusznyák* ki-

sérletei kétségtelenül egy igen fontos és gyorsan végezhető vizsgálati eljárással bővítették a kémiai elemzést, t. i. a fent említett sóoldatok segítségével a vizsgálandó plasma kicsapott fehérjezavarosodásokból (nem fehérje oldatokból) határozta meg a plasma fehérjefraksiót. *Rusznják* nephelometerrel nyert eredményeit gravimetriás eljárással hasonlította össze és a két eljárás eredményeit megegyezőnek találta.

Rona és *Kleinmann* a *Rusznják*-féle módszer megbízhatóságát kétségbe vonták, azzal az indokolással, hogy a neutralis sók okozta fehérje csapadékok pehelyképződésre hajlamosak s így már rövid idő múlva nem az eredeti értékekkel megegyező fokok olvashatók le a nephelometeren. *Rusznják* egy később megjelent dolgozatában kísérletileg igazolja módszerének helyességét, amennyiben adatokat közöl arra nézve, hogy a fehérjezavarosodási fokok egy óra múlva sem mutatnak mérhető változást. Vizsgálataink során mi is végeztünk erre irányuló kísérleteket, s azt találtuk, hogy a zavarosodási fokok 30 percen belül nem adnak számottevő különbséget. Hogy *Rusznják* módszere mind diagnostikai, mind kísérletes kutatások céljaira mennyire alkalmas, azt legjobban elterjedése bizonyítja. *Oudendal*, ki a gümőkór prognózisát serumvizsgálatokra alapítja, a *Rusznják*-féle módszert az albumin-globulin hányados meghatározásában éppenséggel ellenőrző methodusként alkalmazta. Legújában figyelmreméltó, alapos tanulmányában *Rademaker* számolt be nephelometriás serum vizsgálatairól, melyben *Rusznják* eredményeinek és módszerének helyességét újra igazolta.

Kísérleteinkben hármas cél vezetett: 1. A *Rusznják*-féle nephelometriás eljárással nyert fehérjefraksiók értékeinek a *Howe*-féle nitrogen-meghatározásokon alapuló módszer eredményeivel történő összevetése.

2. A *Zeiss* féle stufenphotometert, mint nephelometert e cél szolgálatába állítani.

3. Sorozatos experimentalis és klinikai fehérjefraksiókat meghatározó vizsgálataink céljaira gyors és megbízható eljárást kidolgozni.

Ugy jártunk el, hogy a vizsgálandó vért isotoniás 3.8%-os natriumcitrat oldatba (2 ccm 3.8%-os natr. citr. oldat + 8 ccm vér) vettük le, erősen lecentrifugáltuk és az így nyert citratplasmában minden esetben külön-külön nephelometriás és *Howe*-rendszerű fehérjefraksiós meghatározást végeztünk.

A nephelometeren leolvasott zavarcsodás-fokokat *Howe Kjeldahl*-rendszerű meghatározása útján nyert adatok alapján számítottuk át fehérjeértékekre. Ez értékek megállapítása legegyszerűbben grafikus uton történhet. Ha a különféle plasmákból nyert zavarosodás-fokokat a koordinata-rendszer abszcissájára visszük, a *Howe*-módszerrel ugyanazon plasmából kapott fehérje-értékeket pedig az ordinatára rajzoljuk fel, egy lineáris pont sorozathoz jutunk. E calibrációs egyenes felhasználásával tetszőszerinti nephelometer-fokhoz tartozó fehérje-érték az ordinatán azonnal leolvasható.

Szükséges oldatok: 1. Ammoniumsulfattal féltelített $n/10$ HCl oldat (500 ccm telített ammon. sulf. oldat + 500 ccm $n/5$ HCl oldat).

2. Féltelített ammoniumsulfat oldat (500 ccm telített ammon. sulf. + 500 ccm dest. víz).

3. Ammoniumsulfat oldat, mely úgy készül, hogy a telített ammon. sulf. 270 ccm-éhez 730 ccm dest. vizet adunk.

A nephelometriás vizsgálat menete a következő volt: 1 ccm plasmát 10 ccm-es mérőhengerbe pipettáztunk, utána fiziologiás natriumchlorid oldattal a 10-es jelig feltöltöttük, s jól összekevertük. Míg *Rusznják* módszere az össz. fehérje és globulin meghatározásakor 0.1 ccm plasmával dogozott, addig mi célszerűnek láttuk a meghatározandó plasmát a fentiek szerint hígítani, hogy így az egyrészt kis mennyiségek pipettázása útján elkerülhetetlen hibákat lehetőség szerint kiküszöböljük, másrészt, hogy finomabb eloszlású fehérje-csapadékhöz jussunk.

Három *Erlenmeyer*-lombikot megszámoztunk, az első lombikba tettünk a fenti 1:10 hígított plasmából 1 ccm-t, s ehhez óvatos és állandó elegyítés közben egy 50 ccm-es pipettából lassan hozzáfolyattunk az 1. számú ammon. sulfatból.

A második lombikba ugyancsak 1 ccm hígított plasmát tettünk s a fenti körülmények között pipettából 25 ccm (-t adtunk hozzá a 3. számú ammon. sulfat oldatból) féltelített ammoniumsulfatot (2. számú oldat) folytattunk hozzá.

A harmadik lombikba 0.4 ccm hígítatlan plasmát vittünk és ugyancsak hasonló körülmények között 25 ccm-t adtunk hozzá a 3. számú ammoniumsulfat oldatból.

Az első számú *Erlenmeyer*-lombikban ily eljárás mellett tehát kicsapódik az összfehérje, a második lombikban a globulin és fibrinogen, a harmadikban pedig

egyedül csapódik ki a fibrinogen. Az egyes lömbikok zavaros tartalmát kb. $\frac{1}{2}$ perccel az elegyítés után beöntöttük a cuvettába és behelyeztük a photometerbe. A meghatározásokat minden esetben S. 61 jelzésű fényszűrővel és 2-es „Vergleichslicht“ mellett végeztük. A leolvasásokat $\frac{1}{2}$ —1 perc múlva kezdtük meg. Mint már említettük, ezzel párhuzamosan végeztük ugyanazon citralplasmában a fehérjefraksiók meghatározását a Howe-féle módszer szabályainak pontos megtartásával.

Mint a grafikonból is látható, összesen 28 esetben a kétféle eljárással nyert értékek legnagyobb eltérése 10%-ot tesz ki.

Természetesen mivel a meghatározásokat citratplasmában végeztük (2 ccm natr. citr. + 8 ccm vér), a nativ plasma fehérje-tartalmát végeredményben úgy kapjuk meg, hogy a fenti értékekhez még azoknak 25%-át hozzáadjuk.

Az alábbiakban az eljárás és számítás menetét, egy esetben, részletesen ismertetjük. Levettünk 8 ccm vért 2 ccm isotonias citraloldatba (hígítás 4:1). Ezt azonnal centrifugáltuk és a plasma 1 ccm-ét physiologiás NaCl oldattal tízszeresére hígítottuk. Ebből 1 ccm-t 100-as Erlenmeyer-lömbikba vittünk és ehhez hozzáadtunk 50 ccm ammon. sulf-ra féltelített n/10 HCl-t (1. sz. oldat). Ezzel az oldattal megtöltöttük a 2.5 mm átmérőjű cuvettát, majd $\frac{1}{2}$ percnyi várakozás után megkezdtük a leolvasást a nephelometeren. A tíz leolvasás középértéke 26.6, ennek megfelelően a relativ zavarosodás (R) az eszkozhöz tartozó táblázatból kiszámítva vagy a következő képlet alapján:

$$R = \frac{100}{A} \cdot 100$$

ahol A = a nephelometeren leolvasott érték, egyenlő 375. Ezen fehérje-zavarosodási-fokhoz tartozó fehérje-érték a fenti grafikonon leolvasva 4.9%. Tekintettel arra, hogy citralplasmával dolgoztunk, a kapott 4.9%-hoz ennek 25%-át még hozzá kell adni, hogy a nativ plasma összfehérje tartalmát, 6.1%-ot, megkapjuk.

A globulin-meghatározáshoz ugyancsak a hígított plasma 1ccm-ét egy 100-as Erlenmeyer-lömbikba pipettáztuk, s hozzáfolyattunk 25 ccm féltelített ammonium-sulfat oldatot (2. sz. oldat). A leolvasásokat az előbbihez hasonló módon végeztük és azok középértékeként 57-et találtunk, — ennek megfelelően a táblázatból leolvasott zava-

rosodási fok 175, a hozzátartozó fehérje-érték 1.12%. Mivel a féltelített ammonium-sulfat oldattal a globulinnal együtt a fibrinogen is kikapcsolódik, a globulin kiszámítását csak a fibrinogen meghatározása után végezhetjük el oly módon, hogy a kapott fibrinogen értéket a fenti globulin + fibrinogent jelentő értékből kivonjuk.

A fibrinogen-meghatározáshoz a hígítatlan plasma 0.4 ccm-ét dolgoztuk fel, hozzáadva 25 ccm-t a fent megadott hígítású ammonium-sulfatból (3. sz. oldat). A leolvasásokat az előbbihez hasonló módon elvégezve, 91-et kaptunk mint középértéket. A zavarosodás foka tehát 110. A fibrinogen a grafikonból leolvastva 0.17%. Ezt kivonva a fent megkapott globulin + fibrinogen értékből (1.12-ből) megkapjuk a vizsgált plasma globulin-tartalmát, 0.94%-ot. Természetesen mind a globulinhoz, mind a fibrinogenhez szintén hozzá kell adni a kapott értékek 25%-át, hogy a nativ plasma fehérje-értékeihez jussunk.

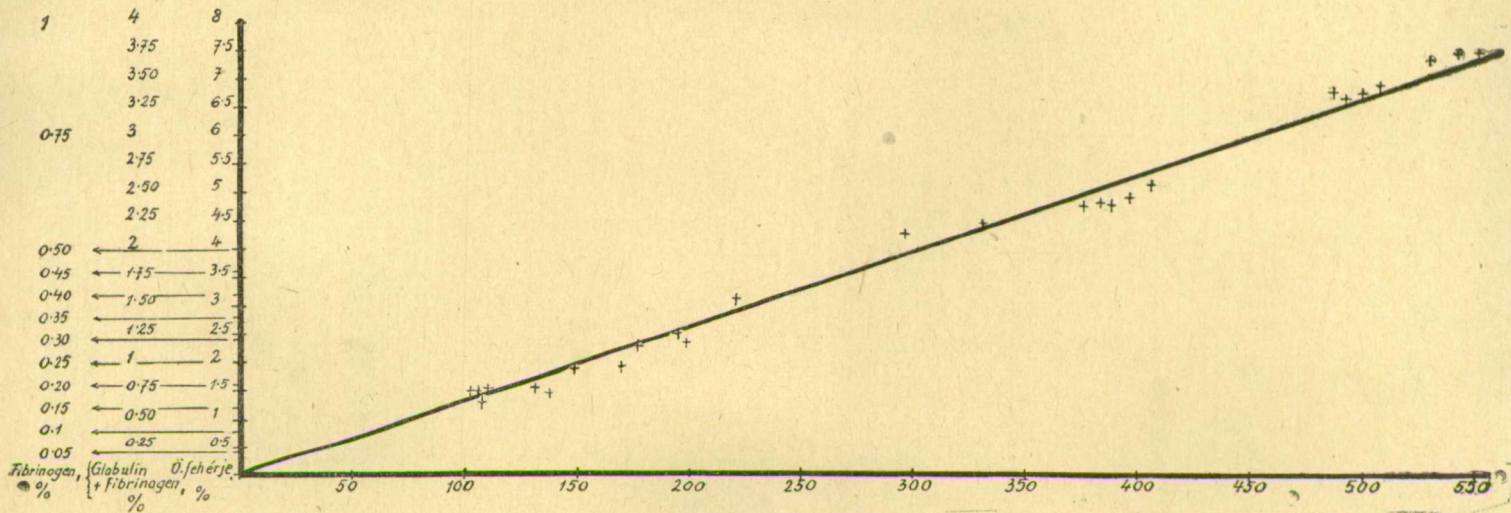
Ezek szerint tehát a vizsgált plasma fehérje-összetétele a következő:

fibrinogen	0.22%
globulin	1.18 „
albumin	4.72 „
	<hr/>
összfehérje	6.12 „

Az albumint úgy kaptuk meg, hogy az összfehérje-tartalomból a globulin+fibrinogen-értékeket kivontuk.

A három fehérje-fraction meghatározása ezen nephelometriás eljárással kis gyakorlattal 10—15 perc alatt elvégezhető, szemben a 4—5 órát igénybe vevő Howe-féle eljárással. Mind klinikai, mind sorozatos kísérleti vizsgálatok elvégzésére a fent ismertetett hibahatárok figyelembe vételével eljárásunkat igen alkalmasnak találjuk.

Irodalom: *Hammersten*: Hoppe—Seylers Chem. Analyse S. 649. Berlin 1909. — *Autenrieth*: Münch. Med. Wschr. 1915. '2. és 1917.8. — *Howe*: Journ. of biol. Chem; 29:1: 109; — *Benard et Labore*: C. v. hebdom. des séances de l Acad. des scian. 1923. 176. 2. 598—101. — *Bloor*: Journ. (Americ.) Chem. Soc. 36. 1300. Journ. of Biol. Chem. 17. 377. — *Kober*: Journ. of Biol. Chem, 1912—13. 13. 485. — *Rusznják*: Biochem. Ztschr. 1922. 133. 370. — *Rusznják*: Biochem. Ztschr. 1923. 141. 479. — *Rona u. Kleinmann*: Biochem. Ztschr. 1923. 140. 461. — *Rusznják*: Biochem. Ztschr. 1923. 144. 147. — *F. L. Oudendal*: Ellermann, Harms et Co. Amsterdam. — *G. A. Rademaker*: Kemink en Zoon, Utrecht, 1933.



Relativ zavarosodás.