

UTJECAJ CISTEINA I CISTINA NA ZGRUŠAVANJE FIBRINOGENA S POMOĆU TROMBINA*)

Nikša Allegretti i Stojanka Buta

Fenomen zgrušavanja krvi razdijeljen je i promatran u nekoliko fragmenata, koji u glavnom odgovaraju shemi, koju su koncem prošloga i početkom ovoga stoljeća predložili začetnici tih istraživanja (Schmidt¹⁾ i kasnije Morawitz²⁾). Njihova se shema održala kao temelj istraživanja problematike zgrušavanja krvi gotovo u nepromijenjenom obliku sve do danas.

Zbog bjelančevinaste prirode nekih sastojaka, koji sudjeluju u mehanizmu zgrušavanja, čitav fenomen i pojedini fragmenti teško su pristupačni potanjoj kemijskoj razradbi. Zato se općenito još uvijek upotrebljava — analogno kao u kemiji fermentata — metoda istraživanja djelovanja pojedinih kemijskih spojeva na pojedinačne faze, i po ishodu takvih reakcija zaključuje o kemizmu i funkciji tvari, koje sudjeluju u čitavom procesu.

Za mehanizam jedne od takvih zasebnih faza drži se, da je funkcija tvari tiolne i disulfidne naravi. Oslanjajući se na takvo tumačenje jednog dijela reakcionog mehanizma, objavljen je u posljednje vrijeme čitav niz rasprava.

Novi put u ovom istraživanju otvorili su Mueller i Sturgis³⁾ našavši produljeno vrijeme zgrušavanja oksalatne plazme, ako joj je prethodno bio dodan cistein. Ovo su nastavili i razradili Kühnau i Morgens terna⁴⁾ i pokazali, da od svih istraživanih spojeva (cistein, glutathioniol, ergotionein i tiolhistidin) glutathioniol ima najjači učinak. Po njihovim navodima glutathioniol i glutathion-disulfid djeluju u istom smislu. Nadalje oni tvrde, da obje ove tvari produljuju vrijeme zgrušavanja krvi odnosno fibrinogena djelujući kod toga na trombin.

Mišljenje, da je trombin ferment djelatan samo u nazočnosti slobodnih tiolnih skupina, nije se moglo održati upravo zbog spomenutog jednakog djelovanja obaju oblika glutathiona. No otopina trombina pokazuje slabu nitroprusidnu reakciju, koja se daje pojačati kalijevim cijanidom. Time se je došlo do zaključka da trombin nije disulfidne naravi i da djelovanje glutathion-tiola ne leži u redukciji trombina u tiolni oblik. Nakon ovoga prevladalo je mišljenje da glutathioniol djeluje na zgrušavanje krvi odnosno fibrinogena tako, da stvara kompleksne spojeve sa teškim metalima, naročito bakrom i željezom.

Strughold i Wöhlisch⁵⁾ stoje na stanovištu, da je trombin ferment, koji katalizira spontano zgrušavanje fibrinogena i da je zgrušavanje fibrinogena zagrijavanjem isti proces kao i zgrušavanje pomoću trombina. Prema njima se u oba slučaja radi o denaturaciji fibrinogena, t. j. o oksidaciji njegovih tiolnih skupina.

F. i M. Bernheim⁶⁾ potvrdili su spomenute navode. Oni su pokazali, da 4-amino-2-metilnaftol katalizira oksidaciju tiolnih skupina. Spo-

*) Predavano u Društvu za eksperimentalnu medicinu u Zagrebu, dne 30. prosinca 1948.

jevi, koji imaju aktivnost kao vitamin K imaju u svojoj molekuli naftokinonsku strukturu i oni mogu također katalizirati oksidaciju tiolnih skupina.

L. F. i M. Fieser⁷⁾ tvrde, da derivati 2-metil-1,4-naftokinona stvaraju konjugate s bjelančevinama, koje u svojoj molekuli sadrže tiolne skupine.

Jeney, Valyi-Nagy i Magyari⁸⁾ istraživali su pojačanje heparinskog djelovanja, koje nastaje dodatkom nekih redoks-indikatora. Oni su našli, da djelovanje ovih opada ovim redom: metilensko modriilo, safranin, neutralno crvenilo, o-klorfenol-indofenol i fenol-m-sulfonat-indo-2,6-dibromfenol. Djelovanje elektropozitivnih boja bilo je obrnuto djelovanju elektronegativnih boja. Ekstrakt jetre imao je u njihovim pokusima anti-heparinsko djelovanje, što su oni pripisali glutationu odnosno cisteinu. Prema njima, dakle, tiolne skupine ubrzavaju zgrušavanje krvi.

U novije vrijeme Baumberge⁹⁾, na temelju polarografskog istraživanja fibrinogena ponovno tvrdi, da fibrin nastaje iz fibrinogena oksidacijom njegovih tiolnih skupina. Prema njemu takvu oksidaciju katalizira trombin. Ove njegove tvrdnje su nepotpuno argumentirane i ne daju potpuni uvid u tok ove pretvorbe.

Jeney, Valyi-Nagy i Vacz¹⁰⁾, u jednoj svojoj kasnijoj objavljenoj radnji također tvrde, da je zgrušavanje fibrinogena oksidacija tiolnih skupina u njegovoj molekuli.

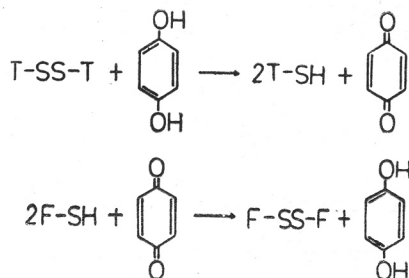
Chargaff¹¹⁾ navodi u svojoj monografiji neobjavljene rezultate Brand-a, Kassela i Ziff-a, po kojima je dokazana nazočnost tiolnih skupina u fibrinogenu reakcijom sa porfirindinom.

Prema Jacques-u¹²⁾ fibrinogen reducira vodikov superoksid i jod. Ovakav oksidirani fibrinogen bio je međutim i dalje koagulabilan, pa nije jasno, na koje mjesto u molekuli fibrinogena zahvaćaju gornji spojevi.

Lions¹³⁾ pripisuje zgrušavanje fibrinogena oksidaciji njegovih tiolnih skupina i kaže, da stvaranjem disulfidnih vezova nastaju niti fibrina.

Chargaff i Bendich¹⁴⁾ dobili su zgrušavanje fibrinogena dodatkom ninhidrina, kloramina-T, 1,4-naftokinon-2-sulfonata, 1,2-naftokinon-4-sulfonata, salicilaldehida i aloksana bez nazočnosti trombina. Gerber i Blanchard¹⁵⁾ ovo pobijaju, izuzevši iz spomenutih spojeva salicilaldehid. Dodatkom potonjeg dobili su i oni ugrušak iz fibrinogena, ali je ovaj bio mnogo manje kompaktna od trombinskog. Oni su istraživali djelovanje hidrokinona na zgrušavanje fibrinogena pomoću trombina i vidjeli, da je dodatkom hidrokinona zgrušavanje ubrzano. Mehanizam takvog katalitičkog djelovanja hidrokinona tumače oni ovako:

(F = fibrinogen, a T = trombin)



Hidrokinon prema tome reducira trombin, pretvara se u kinon, koji oksidira fibrinogen, t. j. stvara fibrin. Hidrokinon dakle u ovom pokusu katalizira zgrušavanje fibrinogena.

Nakon ovih radova Lyons-a i Garber-a i Blanchard-a shema zgrušavanja fibrinogena izgledala bi ovako:



Fibrinogen F-SH $\xrightarrow{\hspace{2cm}}$ Fibrin F-SS-F. Trombin, dakle, oksidira tiolni fibrinogen u disulfidni fibrin.

Napokon, Gerber i Blanchard, navode i čitav niz spojeva, kao cistein, cistin, glutation-tiol i glutation-disulfid koji produljuju vrijeme zgrušavanja fibrinogena. Ovi spojevi kao i hidrokinon djeluju u procesu zgrušavanja fibrinogena na trombin. No autori nisu dali tumačenje ovoga djelovanja.

Istraživanja, koja smo izvršili i kojih rezultate prikazujemo u ovoj raspravi, kretala su se oko pitanja, da li cistein i cistin odnosno glutation-tiol i glutation-disulfid djeluju na reakcioni mehanizam zgrušavanja krvi u istom smislu, t. j. produljujući vrijeme zgrušavanja. Osim toga pokušali smo provjeriti poznato opažanje, koje, kako nam se čini, ne dopušta siguran zaključak, da li malo prije spomenute tvari zahvaćaju svojim djelovanjem fibrinogen ili trombin.

Opis pokusa

U našim istraživanjima služili smo se ovim metodama.

Protrombinsko vrijeme određivali smo po metodi Quick-a upotrebom preparata trombokinaze (»Roche«).

Određivanje vremena zgrušavanja fibrinogena vršili smo u uskim epruvetama kod temperature 37°C, a samo zgrušavanje odmjerili smo pojavom prvog pahuljastog taloga fibrina na staklenoj ušci. U pojedine epruvete stavljano je po 1 ccm otopine fibrinogenorskog preparata, po 0,5 ccm dodatka (cistein, cistin i t. d.) različitih koncentracija i po 0,5 ccm 0,010% otopine trombina (»Roche«).

Fibrinogen smo priredili najprije po metodi Laki-a¹⁶⁾, zatim drugi preparat po bitno različitoj metodi Keckwick-a i Mackay-a¹⁷⁾.

Niz naših pokusa zgrušavanja izveli smo i tako, da smo pustili da otopina trombina odnosno fibrinogena prethodno stoji stanovito vrijeme (od 5 do 60 minuta) s cisteinom odnosno cistinom, i tek nakon toga upotrebi u pokusu.

Neke naše pokuse zgrušavanja fibrinogena u nazočnosti cisteina izveli smo i u dušikovoj atmosferi.

Pokusi s metilenskim modrilom izvedeni su u Thunberg-ovoj cijevi. U cijev stavljano je po 3 ccm 0,38% otopine fibrinogena, zatim 1 ccm takove otopine cisteina, da je koncentracija te tvari u cijelom ogledu iznosila 10⁻³m. U šuplji čep stavljali smo po 1 ccm otopine metilenskog modrila (1:5000) u m/15 fosfatnom puferu pH 7,4. Cijev je zatim evakuirana, dočivena je otopina metilenskog modrila i odmjerena brzina odbojadanja. I u ovim pokusima primijenjena je otopina fibrinogena, koja je prethodno stajala u dodiru sa cisteinom. Upotrebljeno metilensko modrilo i preparat fibrinogena nisu sadržavali željeza.

Cistein-hidroklorid upotrebljen u našim pokusima (»Merck«) otapan je u vodi. l-Cistin (»Merck«) pripremljen je tako, da je odvaganoj koli-

čini tvari uz vodu dodana i potrebna količina solne kiseline, da se dobije hidroklorid i time tvar otopi.

Kao tiolne tvari u nekim pokusima upotrebili smo otopinu glutationa (»Roche«) i vodenu emulziju 2,3-ditioglicerina (»BAL«) priređenog u zavodu.

Pregled i ocjena rezultata

Određivanjem protrombinskog vremena oksalatne plazme ku- nića, zamorca ili čovjeka uz dodatak cisteina ili cistina dobili smo rezultate, koji na prvi pogled govore o različitom djelovanju ovih tvari. Kako se iz rezultata, predočenih u tabeli I. odnosno grafički u slici 1. vidi, ustanovili smo najprije, da male koncentracije cisteina skraćuju protrombinsko vrijeme, dok ga veće produljuju. Jednako smo tako mogli ustanoviti, da se u opisanim pokusima sa l-cistinom mijenja protrombinsko vrijeme tako, da se samo produljuje. (Tabela II. i sl. 1.)

Tabela I.

Koncentracija cisteina u ogledu	Protrombinsko vrijeme u sekundama
$0,8 \times 10^{-2}$ m	15
$1,0 \times 10^{-2}$ m	12
$0,3 \times 10^{-1}$ m	19
$0,5 \times 10^{-1}$ m	41
$0,8 \times 10^{-1}$ m	43
$1,0 \times 10^{-1}$ m	44
Destilirana voda u ogledu	27

Ovo opažanje ponukalo nas je, da spomenute pokuse izvedemo i sa fibrinogenim preparatom uz primjenu čistog trombina.*)

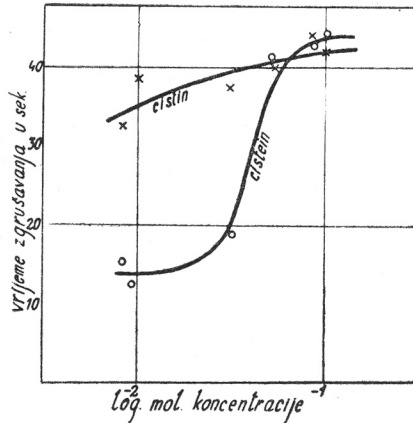
U tim pokusima mogli smo prije svega utvrditi, da je vrijeme zgrušavanja otopina obih preparata fibrinogena istovetno.

Rezultati pokusa izvedenih s fibrinogenom u skladu su s rezultatima naših pokusa dobivenih mjerenjem protrombinskog vremena, kako je to vidljivo predočeno u tabeli III.

*) Otopina fibrinogenog preparata u ovim pokusima sadržavala je 0,27% fibrinogena. Koncentracija fibrinogena određena je po metodi M y. l o n-a i suradnika¹⁸⁾.

Tabela II.

Koncentracija cistina u ogledu	Protrombinsko vrijeme u sekundama
$0,8 \times 10^{-2}$ m	32
$1,0 \times 10^{-2}$ m	38
$0,3 \times 10^{-1}$ m	37
$0,5 \times 10^{-1}$ m	40
$0,8 \times 10^{-1}$ m	44
$1,0 \times 10^{-1}$ m	42
Destilirana voda u ogledu	24



Sl. 1.

Osim toga ovi pokusi dopuštaju zaključak, da cistein odnosno cistin uz dodatak trombina zahvaća u fazu pretvorbe fibrinogena u fibrin. (Trombin je dodavan odmah nakon dodatka cisteina odnosno cistina.) Ti rezultati pokazuju da rastuće koncentracije cisteina skraćuju sve više vrijeme zgrušavanja, dok se naprotiv u pokusima s jednakim koncentracijama cistina dobiva produljeno vrijeme zgrušavanja fibrinogena, pa i do preko 3 minute. Prema tome opisani rezultati ne bi bili u suglasju s navodima Mueller-a i Sturgis-a³⁾ te Kühnau i Morgens-tern-a⁴⁾, po kojima bi i cistein i cistin produljivali vrijeme

zgrušavanja krvi zahvaćajući u fazu pretvorbe protrobina u trombin.

Tabela III.

Koncentracija cisteina dodanog u ogledu fibrinogenu	Vrijeme zgrušavanja fibrinogena nakon dodatka trombina (u sekundama)
$0,8 \times 10^{-2}$ m	25
$1,0 \times 10^{-2}$ m	23
$0,3 \times 10^{-1}$ m	20
$0,5 \times 10^{-1}$ m	18
$0,8 \times 10^{-1}$ m	17
$1,0 \times 10^{-1}$ m	14
Destilirana voda dodana u ogledu fibrinogenu	26

Ostalo je još otvoreno pitanje, da li cistein odnosno cistin djeluju na fibrinogen ili na trombin, i to zbog toga, što se drži da su fibrinogen i trombin također nosioci tiolnih odnosno disulfidnih funkcija.

Da bi i na ovo odgovorili, izvršili smo niz određivanja, u kojima smo upotrebili otopine trombina odnosno fibrinogena, koje su, kako je već u opisu pokusa rečeno, prethodno bile u kraćem ili duljem dodiru s cisteinom ili cistinom. Rezultate tih pokusa predočuju tabele IV. i V. i slika 2. Kako se iz naših pokusnih podataka razabire, prethodni dodir trombina s cisteinom odnosno cistinom, bez obzira na trajanje, nema učinka na vrijeme zgrušavanja, ili drugim riječima, opisano djelovanje spomenutih tvari ostaje nepromijenjeno. Naprotiv ishod pokusa, u kojima je pod istim uvjetima upotrebljen fibrinogen jest drugačiji. U pokusima, u kojima je upotrebljeni fibrinogen kraće vrijeme stajao u dodiru s cisteinom, vrijeme zgrušavanja bilo je skraćeno, a produljeno kad je upotrebljen fibrinogen, koji je s cisteinom stajao dulje vrijeme. Tako je na primjer prethodno stajanje fibrinogena s cisteinom u vremenu između 15 i 20 minuta dalo rezultate jednake onima s destiliranom vodom, dok su se nakon duljeg dodira vrijednosti približavale postepeno vremenu od kojih 40 sekunda. Da bi isključili sumnju na eventualni utjecaj temperature od 37°C izvršili smo kontrolne pokuse i s destiliranom vodom, pri čemu su (kako se iz tabele razabire) dobivene vrijednosti od oko 25 sekunda. U jednako izvedenim pokusima s cistinom

izostala je faza skraćanja vremena zgrušavanja, a očitovala se samo faza produljenja manje više jednakog ishoda kao i u pokusu s cisteinom. Napokon, i pokusi izvedeni u dušikovoj atmosferi pokazuju, da cistein redovito mijenja vrijeme zgrušavanja fibrinogena od 25 na oko 9 sekunda, bez obzira na duljinu prethodnog stanja fibrinogena u dodiru s cisteinom, kako se to lijepo razabire iz slike 2. Ovi pokusi u dušikovoj atmosferi napo-

Tabela IV

Najprije se 0,5 ccm 0,01% otopine trombina pomiješa s 1 ccm destilirane vode odnosno otopine cisteina (cistina) i na taj način postigne konačna koncentracija cisteina (cistina) 1×10^{-1} m u cijelom ogledu. Takva smjesa, nakon stajanja u naznačenim vremenskim intervalima, primiješa se 1 ccm 0,268% otopine fibrinogena.

Vrijeme prethodnog stajanja sa cisteinom (dest. vodom) u minutama	Vrijeme zgrušavanja u sekundama	
	sa dest. vodom	sa cisteinom
0	22	10
5	22	14
10	23	13
15	24	9
20	22	10
25	21	10
30	19	11
40	20	12
50	21	11
60	22	13

Vrijeme prethodnog stajanja sa cistinom (dest. vodom) u minutama	Vrijeme zgrušavanja u sekundama	
	sa dest. vodom	sa cistinom
0	21	32
5	24	33
10	22	31
15	20	30
20	22	29
25	22	32
30	22	31
40	23	30
50	23	33
60	22	31

kon jasno dokazuju, da je produljeno vrijeme zgrušavanja fibrinogena, nakon duljeg stajanja sa cisteinom, uzrokovano oksidacijom cisteina.

I pokusi s metilenskim modrilom pokazuju, da spomenuti preparati fibrinogena u nazočnosti cisteina izazivlju redukciju te boje. Kako je vidljivo iz priložene tabele VI., dulje prethodno stajanje fibrinogena s cisteinom umanjuje djelatnost fibrinogena

Tabela V

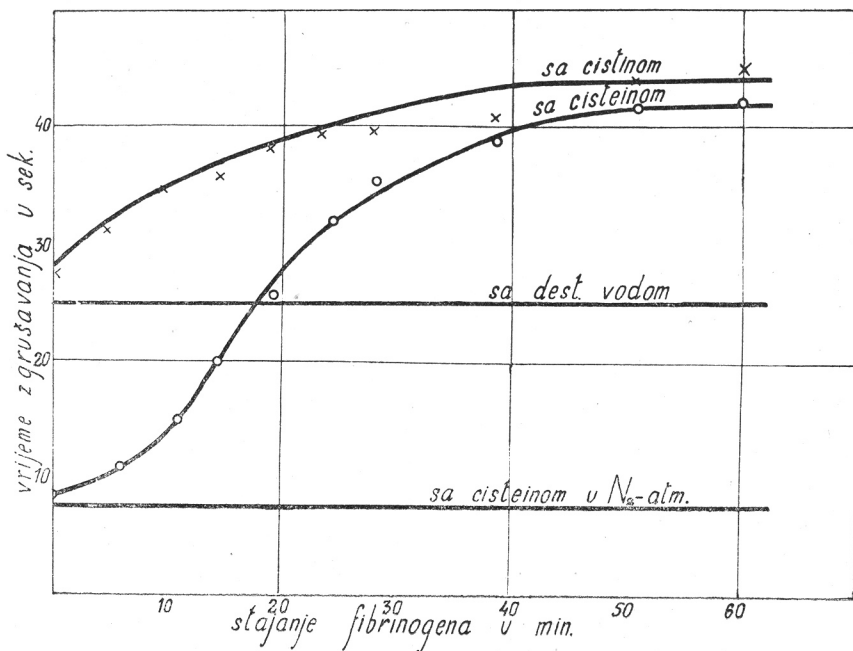
1 ccm 0,028% otopine fibrinogena pomiješa se s 1 ccm destilirane vode odnosno cisteina (cistina) i na taj način postigne konačna koncentracija cisteina (cistina) 1×10^{-1} m u cijelom ogledu. Takva smjesa, nakon stajanja u naznačenim vremenskim intervalima, primiješa se 0,5 ccm 0,01% otopine trombina.

Vrijeme prethodnog stajanja sa cisteinom (dest. vodom) u minutama	Vrijeme zgrušavanja u sekundama	
	sa dest. vodom	sa cistinom
0	24	9
5	24	11
10	23	14
15	21	20
20	25	26
25	20	34
30	23	37
40	22	39
50	22	40
60	23	41

Vrijeme prethodnog stajanja sa cistinom (dest. vodom) u minutama	Vrijeme zgrušavanja u sekundama	
	sa dest. vodom	sa cisteinom
0	23	28
5	23	31
10	25	34
15	25	35
20	24	37
25	25	38
30	24	38
40	20	39
50	21	41
60	23	43

ili cisteina u toj reakciji. Osim toga iz odnosa koncentracija fibrinogena i cisteina može se razabrati, da u tim pokusima nije čitav cistein bio oksidiran, da se uspostavlja neke vrsti ravnoteža, a nešto preostalog cisteina očituje se svojim djelovanjem.

Gotovo istovetni rezultati dobiveni su u pokusima, u kojima je kao tiolna tvar upotrebljen glutation i 2,3-ditioglicerin.



Sl. 2.

Preostaje nam još, da naše rezultate isporučimo s podacima dosadašnjih istraživanja, koje smo u kratko naveli u uvodu ove rasprave i da im damo potrebno tumačenje. Prije svega pitanje je, koja je to tvar, koja je u stanju aktivirati molekularni kisik i biti aktivator vodika tiolne skupine u cisteinu, t. j. da li je to sam fibrinogen ili koja od pratećih tvari zaostala nakon preparacije. Razumije se, da je na ovo pitanje barem za sada još teško odgovoriti. Jedino što bi se već u ovoj prilici moglo istaknuti kao naročitost, jest naše opažanje, po kojem se i u preparaciji fibrinogena po Laki-u¹⁶⁾ i onoj po Keckwick-u i Mackay-u¹⁷⁾ istodobno s fibrinogenom izdvaja i tvar, koja je u stanju oksidirati cistein. Malo je vjerojatno, da bi se u obje,

inače bitno različite preparacije dobila prateća tvar jednakih svojstava. Osobito je pak zanimljivo, da se koagulabilnost otopine fibrinogena stajanjem umanjuje, a paralelno s tim slabi i oksidativno svojstvo takvih fibrinogenских pripravaka.

Tabela VI.

Vrijeme stajanja fibrinogena s cisteinom	Vrijeme odbojadisanja metilenskog modrila
bez cisteina	nema odbojadisanja
0 min.	1 min. 6 sek.
5 „	3 „ 52 „
10 „	5 „ 2 „
15 „	5 „ 26 „
20 „	6 „ 11 „
25 „	6 „ 18 „
30 „	6 „ 26 „
40 „	6 „ 34 „
50 „	6 „ 41 „
60 „	6 „ 51 „

Na temelju svih iznesenih naših eksperimentalnih podataka može se ustvrditi, da cistein skraćuje vrijeme zgrušavanja, da pri tome djeluje na fibrinogen, zatim, da su fibrinogenски preparati dobiveni po L a k i-u, odnosno po K e c k w i c k-u i M a c k a y-u u stanju oksidirati, u nazočnosti molekularnog kisika, cistein u cistin i da cistin produljuje vrijeme zgrušavanja fibrinogena, djelujući pri tome također na fibrinogen.

Prema tome naši bi rezultati bili u protivštini s opažanjem K ü h n a u-a i M o r g e n s t e r n-a⁴⁾, koji tvrde, da cistein ima jednako djelovanje kao i cistin, odnosno glutathion-tiol kao glutathion-disulfid.

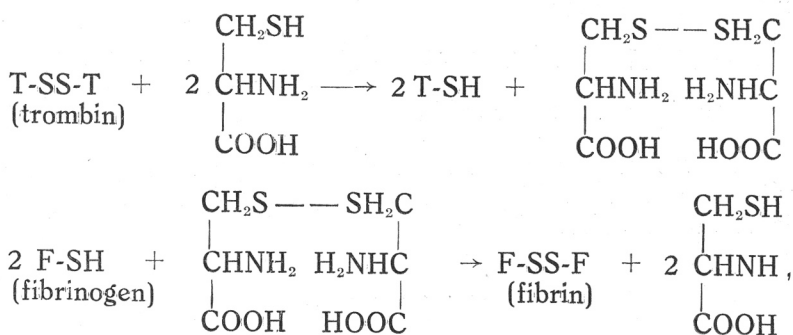
Da u krvi postoji dehidraza (glutathion-dehidraza), pa prema tome samo disulfidni oblici, pokazali su R o s e n t h a l i V o e g t l i n¹⁹⁾, G a b b e²⁰⁾ pa i K ü h n a u i M o r g e n s t e r n⁴⁾, a po našim opažanjima upravo su disulfidni oblici odgovorni za produljeno vrijeme zgrušavanja fibrinogena. Glutathion-dehidraza nije poblizje istražena, a njena djelatnost nije uzeta u obzir pri upoznavanju djelovanja cisteina (glutathiona) na zgrušavanje krvi.

Osim toga i navodi K ü h n a u-a i M o r g e n s t e r n-a, po kojima cistein i cistin djeluju jednako na zgrušavanje krvi, a koji su u protivštini s našim rezultatima, dadu se ipak razumjeti upravo po ishodu naših pokusa. Spomenuti autori nisu naime

uopće uzeli u obzir, da cistein može biti prethodnim stajanjem kod pripravljanja reakcionih smjesa (serija epruveta), zahvaćen glutation-dehidrazom (iako im je postojanje toga fermenta bilo poznato), preveden u cistin i na taj način izazvati sliku cistin-skog djelovanja. Razumljivo je zato, da su spomenuti autori mogli tako dobiti samo drugi dio cisteinske krivulje predočene u slici 2. Ovaj dio cisteinske krivulje, kako je vidljivo ne razlikuje se mnogo od cistinske krivulje. Dio cisteinske krivulje, koji odgovara produljenju vremena zgrušavanja ne može se drugačije protumačiti, nego samo dehidracijom, t. j. oksidacijom cisteina u cistin. Naš pokus u dušikovoj atmosferi bio je odlučan za dokaz ove tvrdnje, jer je u tom pokusu uspjelo pokazati, da cistein (a jednako tako glutation-tiol i 2,3-ditioglicerin) skraćuju vrijeme zgrušavanja fibrinogena, kad im je sačuvana tiolna funkcija.

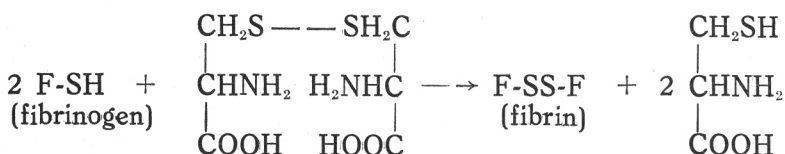
Pokušamo li na kraju naše rezultate primijeniti za tumačenje ishoda pokusa, u kojima je upotrebljena čitava plazma, to bi se i za takav slučaj moglo pretpostaviti, da je kod primjene malih koncentracija cisteina stvorena premala koncentracija disulfidne tvari koja bi bila potrebna da produlji vrijeme zgrušavanja, odnosno protrombinsko vrijeme. Kod primjene većih koncentracija cisteina bilo je mogućnosti i za tvorbu većih koncentracija cistina pa prema tome i za cistinsko djelovanje.

Teoretsko tumačenje opisanoga fenomena može se sasvim dobro ugraditi u spomenuti reakcioni model G e r b e r-a i B l a n c h a r d-a o ubrzavajućem djelovanju hidrokinona na zgrušavanje fibrinogena s pomoću trombina. Kako je poznato, takvu aktivnost imaju samo oni difenoli, koji se dadu reverzibilno oksidirati. Ako bi na analogan način pokušali tumačiti katalitičko djelovanje cisteina u atmosferi dušika, to bi takva reakcija tekla ovako:

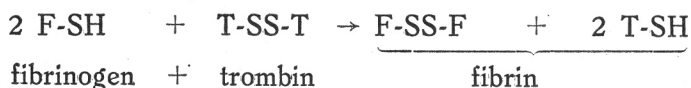


t. j. posredovanjem cisteina dobivamo po toj reakcionoj shemi fibrin. Ali, jer se dodatkom cisteina zgrušavanje fibrinogena ubr-

zava, to možemo reći, da se to zbiva zbog toga, što je prijenos vodika sa fibrinogena na trombin, u nazočnosti i cistein-cistin redoks-sustava, također pospješeno. No, razmotrimo li za trombin pod istim uvjetima cistinško djelovanje na zgrušavanje fibrinogena, to nije teško uočiti, da se takva reakcija ne može odviti po spomenutoj shemi, dok se naprotiv za fibrinogen reakcija ipak može odviti ovako:



t. j. i ovdje fibrinogen reagira sa cistinom i pri tome, kao i gore, nastaje fibrin. Ipak treba posumnjati, da li je konačni produkt doista fibrin, jer je u potonjem slučaju po rezultatima naših istraživanja, stvaranje ugruška usporeno, a kod većih koncentracija cistina uopće nema pojave zgrušavanja. Drugim riječima dodatkom cisteina ugrušak se stvara brže, dok se dodatkom cistina stvara polaganije ili se u opće ne stvara. Isporedbom predloženi reakcionih shema vidimo među konačnim produktima, u prvom slučaju reducirani trombin (T-SH) i oksidirani fibrinogen (F-SS-F), dok u drugom slučaju imamo oksidirani trombin (T-SS-T) i oksidirani fibrinogen (F-SS-F). Ova druga mogućnost isključena je uostalom i rezultatima istraživanja Brand-a, Kassel-a i Seidel-a²¹⁾, po kojima je količina cisteina u fibrinogenu i fibrinu jednaka. Shema zgrušavanja fibrinogena s pomoću trombina (u kojoj T označuje trombin, a F fibrinogen) izgledala bi ovako:



Prema tome se pretvorba fibrinogena s pomoću trombina odvija tako, da konačni produkt t. j. ugrušak sadržava reducirani trombin i oksidirani fibrinogen.

Zaključni izvodi

1) Cistein (glutation-tiol i 2,3-ditioglicerin) skraćuje in vitro protrombinsko vrijeme oksalatne plazme i vrijeme zgrušavanja fibrinogena, a cistin oboje produljuje.

2) Učinak cisteina (glutation-tiola i 2,3-ditioglicerina) na vrijeme zgrušavanja fibrinogena zavisi o vremenu prethodnog stajanja ovih tvari s otopinom fibrinogena.

3) Djelovanje spomenutih spojeva, nosioca tiolnih i disulfidnih funkcija, ne odvija se na trombinu već na fibrinogenu.

4) Laboratorijski dobiveni preparati fibrinogena vjerojatno sadržavaju i glutacion-dehidrazu, koja bi bila odgovorna za oksidaciju tiolnih oblika spomenutih tvari u disulfidne oblike. Opaženo je, da se taj pretvor mijenja s koagulabilnošću fibrinogena, u čemu bi se mogla nazrijeti njegova identičnost s glutacion-dehidrazom. Djelatnost ovoga fermenta bila bi odgovorna i za one rezultate poznate iz literature, na temelju kojih je zaključeno, da tvari tiolnih i disulfidnih oblika imaju jednaki učinak na zgrušavanje fibrinogena s pomoću trombina.

5) Shematska predodžba procesa zgrušavanja fibrinogena s pomoću trombina dovodi do zaključka, da se proces može odvijati tako samo onda, kad se konačni produkt sastoji ne samo iz oksidiranog fibrinogena, nego i iz reduciranog trombina. S tim u vezi valjalo je pomisliti, da trombin reagira s fibrinogenom stehiometrijski.

LITERATURA

- 1) Schmidt A., Zur Blutlehre, Leipzig 1892.
- 2) Morawitz P., Beitr. chem. Physiol. u. Path., 4, 381 (1904). Cit. po Morawitz P., Ergebn. Physiol., 4, 307 (1905).
- 3) Mueller J. H. i Sturgis S., Science, 75, 140 (1933).
- 4) Kühnau J. i Morgenstern V., Z. physiol. Chem., 227, 145 (1934).
- 5) Strughold H. i Wöhlisch E., Z. physiol. Chem., 223, 267 (1934).
- 6) Bernheim F. i Bernheim M. L. C., J. Biol. Chem., 134, 457 (1940).
- 7) Fieser L. F. i Fieser M., Organic Chemistry. Boston 1944. Str. 738 i dalje.
- 8) Jeney A. v., Valyi-Nagy T. i Magyary J., Arch. exp. Path. Pharm., 196, 505 (1940).
- 9) Baumberger J. P., Amer. J. Physiol., 133 P, 206 (1941).
- 10) Jeney A. v., Valyi-Nagy T. i Vaczi L., Arch. exp. Path. Pharm., 203, 117 (1944).
- 11) Chargaff E., Adv. Enzymol., 5, 31 (1945).
- 12) Jacques L. B., Biochem. J., 37, 344 (1943).
- 13) Lyons R. N., Nature, 155, 633 (1945).
- 14) Chargaff E. i Bendich A., J. Biol. Chem., 149, 93 (1943).
- 15) Gerber C. F. i Blanchard E. W., Amer. J. Physiol., 144, 447 (1945).
- 16) Laki K., Z. physiol. Chem., 273, 95 (1942).
- 17) Keckwick R. A. i Mackay M. E., Nature, 157, 629 (1946).
- 18) Mylon E., Winternitz M. C. i Sütö-Nagy G. J., J. Biol. Chem., 143, 21 (1942).

- 19) Rosenthal S. M. i Voegtlin C., Publ. Health Rep., 46, 521 (1931).
20) Gabbe E., Verh. physik. med. Ges. Würzburg, 57 67 (1932). Cit. po loc. cit. 4).
21) Brand E., Kassel B. i Seidel L., J. Clin. Investig., 23, 437 (1944).

ZAVOD ZA FIZIOLOGIJU
MEDICINSKI FAKULTET
ZAGREB

Primljeno 1. prosinca 1949.

ZUSAMMENFASSUNG

Cystein- und Cystinwirkung auf die durch Thrombin ausgelöste Fibrinogengerinnung

von

Nikša Allegretti und Stojanka Buta

Die bisherigen Ergebnisse der Untersuchungen über die Cystein- und Cystinwirkung auf die Blutgerinnung wurden verschieden interpretiert. Es wird im allgemeinen angenommen, dass die obenerwähnten Verbindungen eine Verzögerung der Blutgerinnung verursachen und zwar auf diese Weise, dass sie eine Wirkung auf Thrombin bzw. Prothrombin ausüben.

In dieser Arbeit sind die Versuchsergebnisse über die Cystein- und Cystinwirkung auf die Prothrombinzeit und Fibrinogengerinnungszeit dargestellt. Vor allem wurde gezeigt dass die kleinen Cysteinkonzentrationen eine Verkürzung der Prothrombinzeit, während die grösseren eine Verlängerung verursachen.

Venn man vor der Bestimmung der Fibrinogengerinnungszeit das Thrombin und Cystein mischt und die Mischung stehen lässt, so sieht man, dass die Fibrinogengerinnung verkürzt wird, ungeachtet der Zeit während welcher die Mischung von Thrombin und Cystein gestanden hat (Versuchs-anordnung: 0,5 ccm einer Cysteinlösung, wurden mit 1 ccm 0,01%-iger Thrombinlösung (Roche) vermischt derart, dass die Endkonzentration von Cystein 0,1 m war, Diese Mischung stand 5 bis 60 Minuten im Wasserbad (37°C), und wurde in bestimmten Zeitintervallen zu 1 ccm einer 0,27%-iger Fibrinogenlösung zugesetzt. Darauf wurde die Fibrinogengerinnungszeit gemessen). Die Versuche, in denen statt Cystein Cystin angewandt wurde, zeigten eine Verlängerung der Fibrinogengerinnungszeit.

Dieselben Versuche mit einer Fibrinogenlösung, die in Berührung mit Cystein bzw. Cystin stand, zeigten die Abhängigkeit der Fibrinogengerinnungszeit von der Zeitdauer während welcher die Mischung der genannten Substanzen gestanden hat. So sieht man, dass nach kurzem Stehen die Mischung eine Verkürzung der Gerinnungszeit auslöst; mit der wachsenden Berührungszeit wird die Gerinnungszeit immer mehr verzögert, so dass man nach ca. 20 Minuten schon eine Verlängerung hat. Das Zusammenstehen der Fibrinogenlösung mit Cystin dagegen erzeugt von Anfang an eine Verlängerung der Fibrinogengerinnungszeit. Nach einem einstündigen Zusammenstehen war die Cystein- und Cystinwirkung annähernd gleich.

Solche Versuchsergebnisse kann man erklären indem man annimmt, dass Cystein in der Anwesenheit von Fibrinogen und Sauerstoff oxydiert bzw. dehydriert wird. Für diese Schlussfolgerung sprechen die in der Stickstoffatmosphäre ausgeführte Versuche, wo die Fibrinogengerinnungszeit ca. 9 Sekunden war, ohne Rücksicht auf die Zeitlänge des vorherigen Zusammenstehens mit Cystein. Für diese Erklärung spricht auch die Tatsache, dass man die gleichen Resultate mit zwei Fibrinogenpräparate, die nach grundsätzlich verschiedenen Weisen (L a k i, K e c k w i c k und M a c k a y) gewonnen sind, erzielt hat.

Gleichsinnige Resultate erhielten wir auch als wir statt Cystein Glutathion und 2,3-dithioglycerin (BAL) benützt haben. Man könnte annehmen, dass Glutathion das im Blute wegen der Anwesenheit der Glutathiondehydrase immer im oxydierten Zustande vorkommt, für die Ungerinnbarkeit des Blutes *in vivo* verantwortlich wäre.

Auch mit den Versuchen in den T h u n b e r g-röhrchen wurde gezeigt, dass die Fibrinogenlösungen in Anwesenheit von Cystein (Glutathion, BAL) und Sauerstoff Methylenblau entfärben, während mit Cystin keine Entfärbung entsteht.

Man könnte als Folge der erwähnten Resultate den Schluss ziehen, dass die dehydrierende Wirkung der Fibrinogenpräparate mit Fibrinogen selbst identisch sei.

Am Schluss nach den theoretischen Besprechungen der Versuchsergebnisse wurde die Möglichkeit einer nach stöchiometrischen Verhältnissen sich abspielenden Reaktion vermutet.

PHYSIOLOGISCHES INSTITUT
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
ZAGREB, KROATIEN

Eingegangen am 1. Dezember 1949