

Marosvásárhelyi 1. sz. Belgyógyászati Klinika (vezető: dr. Dudea Corneliu egyetemi tanár, az orvostudományok doktora), Klinikai Biokémiai Laboratórium (vezető: dr. Módy Jenő egyetemi előadótanár, az orvostudományok doktora)

AGARÓZ GÉLEKTROFORÉZISSEL NYERT LIPOPROTEIN-FRAKCIÓK SZABAD ZSÍRSAV- ÉS TRIGLICERID-TARTALMÁNAK KIMUTATÁSA NÍLUSKÉK-SZULFÁT ELŐFESTÉSSEL



Módy J.

Az agaróz gélben végzett lipoprotein-elektroforézises frakciók előfestésének módszerét szudán-feketével *Klein és Cooper* (7) 1970-ben ismertette. Az azóta eltelt évtized alatt sok új ismeret gyűlt össze mind a lipoproteinek szerkezetére és összetételére (*Pownall* 8, *Sailer* 9, *Tanford* 11),

mind pedig kórtani szerepére (Havel 4, Keys 6, Sodhi 10, Wieland 12) vonatkozólag. Az egyes lipoprotein-frakciók lipidtartalma és patológiai szerepe közötti összefüggések vizsgálata azonban mindmáig csak bonyolult fiziko-kémiai, vagy biológiai eljárások segítségével lehetséges. Az agaróz gélben elektroforézissel különválasztott lipoproteinek festésére eddig használt lipidfestékek (szudán-fekete, olaj-vörös stb.) semmilyen szelektivitást nem mutatnak, valamennyi lipidfajtaét egyformán megfestik. A vízben oldódó niluskék-szulfáttal viszont a trigliceridek élénk piros, a szabad zsírsavak pedig világoskék színűre festődnek. A niluskék-szulfátnak ezt a szelektivitását a klinikai laboratóriumban eddig csak székletvizsgálatok alkalmával, a zsíremésztés megítélésére használták (Bálint 2). A niluskék-szulfáttal előfestett lipoproteinek agaróz gélben végzett elektroforézises frakcionálása alkalmával kiderült, hogy ez a festékanyag a lipoproteinekben is szelektíve festi a szabad zsírsavakat és a neutrális zsirokat. Ennek alapján jól felhasználható ezek elhelyezkedésének és arányának vizsgálata a lipid-elektroforézis folyamán.

Az eljárás kidolgozását az a megfigyelés sugalmazta, hogy súlyos és kiterjedt gyulladásokkal járó betegségekben (sepsis, vasculitisek, pneumonitis) szenvedő betegek szérumfehérjéinek gél-elektroforézises frakcionálása alkalmával a startpontról éles határu, fehér vonalszerű frakció(k) indul(nak) el és halad(nak) gyorsan az anód felé, olyannyira, hogy 20—30 perc múlva már ki is fut(nak) a gélből. Kiderült, hogy ez a gyorsan vándorló frakció vízben, ecetsavban és a legtöbb szerves oldószerben igen jól oldódik. Nem adja sem a fehérjékre (peptidre), sem a szénhidrátokra jellemző reakciókat, calciumsókkal viszont oldhatatlan csapadékot képez. • A Duncombe-féle (3,5) kolorimetriás módszerrel szabad zsírsavként mennyiségileg is meghatározható. Agar gélben, agaróz gélben végzett elektroforézis alkalmával a szappanok is hasonló módon viselkednek. Kézenfekvő volt tehát az a feltevés, hogy elektromos erőterben a vérsavó szabad zsírsavjai leválnak az őket lazán kötő fehérje(k) felületéről és a pufferoldat Na-ionjaival oldható szappanokat képezve, gyorsan vándorolnak az anód felé. Kifutva a gélből, a pufferedénybe jutnak, ahol mennyiségük pontosan meghatározható és a napi frakcionálások számának növekedésével párhuzamosan nő. Ha a gélelektroforézis folyamán a gyorsan vándorló szabad zsírsavak útjába „csapdát“ állítunk azáltal, hogy Ca-, vagy Cu-sókkal hozzuk össze őket, a találkozás helyén a zsírsavak oldhatatlan Ca-, vagy Cu-szappanok formájában kicsapódnak és helyben maradnak. A keletkezett csapadék szabad szemmel is jól megfigyelhető.

Anyag és módszer

1. Pufferoldat: Aronson és Grönwall (1) szerint 60,5 g/l TRIS-t (0,5 M), 6,0 g/l EDTA-t (0,021 M) és 4,6 g/l bórsavat (0,075 M) 1.000 ml vízben oldunk. Három napi állás után szűrjük. A pufferoldat pH-ja = 8,9.

2. 1 g⁰/₁₀₀ agaróz oldat, a fenti pufferoldatban.

3. Niluskék-szulfát törzsoldat: 2 g niluskék-szulfáthoz 1 csepp tömény NaCl-oldatot cseppentünk, majd deszt. vízzel 10 ml-re töltjük fel. Használat előtt a törzsoldatot pufferoldattal 1:10 arányban hígítjuk.

4. M 50 Cu (NO₃)₂ oldat. Használat előtt megolvastott agaróz géllal egyenlő arányban (v/v) összekeverjük.

Mosott és zsirtalanított tárgylemezekre 3—3 ml megolvasztott agaróz oldatot pipettázunk. A gél megszárulása után a lemezek mindkét végétől 2—2 cm-nyire egy-egy 1 mm széles árkot vágunk. Az anód felőli árokba réznitrát és agaróz keverékét pipettázzuk, a katód felőlibe (start-vonal) a niluskék-szulfáttal előfestett savót. A lipoproteinek előfestése céljából 3 csepp vérsavóhoz 1 csepp 1:10 hígítású niluskék-szulfát oldatot és 4 csepp 40° C-ra lehűtött agaróz oldatot teszünk. A start-árkot ebből az elegyből töltjük meg. Pasteur pipetta segítségével. A lemezeket ezután az elektroforézises kamrába helyezzük. A frakcionálás 120 V feszültség és lemezenként 10 mA áramerősség mellett 3 1/2—4 órán át tart. A frakcionálás befejeztével jól látható a szabad zsírsavak és a neutrális zsírok festődése a lipoprotein-frakciókon belül. Összehasonlítás végett célszerű a niluskék-szulfáttal előfestett lemezekkel párhuzamosan a megfelelő savó szudán-feketével előfestett (6) párját is frakcionálni. Az 1. ábra a szudán-feketével, illetve niluskék-szulfáttal előfestett lipoproteinogramot (1,2), egy 1 g %-os szappanoldat (3), illetve vérsavó és szappanoldat különböző keverékének (4,5) niluskék-szulfáttal előfestett lipidogramját tünteti fel.

A vérsavó lipoproteinjeinek niluskék-szulfáttal való előfestésével agaróz gélben végzett elektroforézises frakcionálása alkalmával eddig a következőket sikerült megállapítani:

1. A vérsavó szabad zsírsavjai pufferolt közegben mint szappanok vannak jelen, így elektroforézis során gyorsan kivándorolnak a közegből. A gyorsan vándorló zsírsavak az anód oldalán vágott „csapdába“ csepegtetett Ca-, vagy Cu-sókkal oldhatatlan szappanok formájában kicsaphatók, niluskék-szulfáttal megfesthetők.

2. Niluskék-szulfáttal előfestett lipidogramokból egyértelműen kitűnik, hogy zsírsavakat nemcsak az albuminok, hanem lipoproteinek (elsősorban a HDL és LDL) is tartalmaznak. A szabad zsírsavak megoszlása az egyes frakciók között különösen gyulladássos (vasculitises) állapotokban változik.

3. Erős gyulladással (vasculitis) járó kórképekben jelentős mértékben megnövekszik a vérsavó szabad zsírsavtartalma, olyannyira, hogy súlyos esetekben a gyorsan vándorló Na-szappanok szabad szemmel is megfigyelhetők a gélben. Egyre fontosabbá válik tehát a szöveti gyulladások és a celluláris lipolízis összefüggéseinek az alapos vizsgálata.

4. A trigliceridek elsősorban a béta-lipoproteinekben (LDL) és a pre-bétában (VLDL) mutathatók ki, de különböző dyslipidaemiák esetén az alfa-1-frakcióban (HDL) is megjelennek. A várakozás ellenére, az eddig vizsgált több, mint száz II. b. típusú dyslipidaemiás eset egyikében sem tartalmaztak a pre-béta lipoproteinek (VLDL) a béta-lipoproteineknel több trigliceridet. A trigliceridként festődő frakció a béta (pre-béta, alfa-1) frakción belül annál jóval keskenyebb, élesen elhatárolt csík formájában jelentkezik.

5. A niluskék-szulfát vizes (pufferes) oldata agaróz gélben erősen katódikusan vándorol. Emiatt egyrészt jól megfesti az ellentétes irányban vándorló (és a „csapdában“ oldhatatlan szappanok formájában kicsapódó) zsírsavakat, másrészt pl. a béta-lipoproteinek (LDL) fokozott neutrális zsirtartalma esetén csökkenti e frakció vándorlási sebességét. Emiatt a szudán-feketével előfestett béta-lipoproteinekhez képest a niluskék-szul-

fáttal élénk pirosra festődő azonos frakció az elektroforézis során hátrább marad.

6. A vérsavóhoz adott Na-szappanok, vagy detergensek (dodecyl-szulfát) már igen kis mennyiségben is jellegzetesen megváltoztatják (magnóvelik) mind a lipoproteinek mobilitását, mind pedig a zsírsavak és trigliceridek eloszlását az egyes frakciókon belül. Ez a jelenség egyrészt a lipidek emulgeálásával, másrészt az apoproteinek denaturálásával magyarázható.

7. A szudán-feketével és niluskék-szulfáttal előfestett lipoprotein-frakcionálás nemcsak a dyslipidaemiák jobb vizsgálatára, hanem a gyulladások (micro-vasculitisek, atherosclerosis) és a szabad zsírsavak mennyiségi változásaival járó szöveti lipolízis kapcsolatainak a további tisztázására is lehetőséget teremt.

Irodalom

1. Aronsson T., Grönwall D.: Science Tools (1958), 5, 2. 521; 2. Bálint P.: Klinikai laboratóriumi diagnosztika. Medicina. Budapest, 1962. 324;
3. Duncombe W. G.: Biochem J. (1963), 88, 7; 4. Havel J.: Circulation (1979), 60, 1, 1; 5. Howorth P. J. N., Gibard S., Marks V.: Clin. Chim. Acta (1966), 14, 69; 6. Keys A.: Acta Med. Scand. (1980), 207, 153; 7. Klein G., Cooper G. R.: Electrophoretic Determination of Serum Lipoproteins (Prestaining Technique). In: Standard Methods of Clinical Chemistry (Mac Donald P. R., ed.), Academic Press, New York, 1970, 127; 8. Pownall H. J., Gotto A. M.: Mechanisms of Lipid Transport by the Human Plasma Proteins. In: Chemistry and Physiology of Human Plasma Proteins (Bing D. H., ed.), Pergamon Press, New York, 1979, 127; 9. Sailer S., Lisch H. J.: Scripta med. Merck (1978), 13; 10. Sodhi H. S.: Med. Prisma (1980), 1; 11. Tanford Ch., Reynolds A. J.: Structure and Assembly of Human Serum Lipoproteins. In: The Chemistry and Physiology of the Human Plasma Proteins (Bing H. D., ed.), Pergamon Press, New York, 1979, 111; 12. Wieland H., Seidel D., Wiegand V., Kreuzer H.: Atheroscl. (1980), 36, 269.

A szerkesztősebbe érkezett: 1981. január 16-án.

E. Mody

PRE-STAINING OF LIPOPROTEIN FRACTIONS IN AGAROSE GEL WITH NILE SULPHATE AND REVEALING FATTY ACIDS AND TRIGLYCERIDES IN LIPOPROTEINS

During the electrophoretic fractionation of lipoproteins in agarose gel buffered with TRIS(EDTA) boric acid, $\text{pH}=8.9$, after prestaining the serum with Nile sulphate, the triglyceride content and that of the free fatty acids of lipoproteins are stained selectively. Due to the action of the electric field, the fatty acids carried by albumins (and by lipoproteins) become detached and they migrate rapidly towards the anode, leaving the gel in some minutes. By making a „trap” at the anodic end of the plates, in which agarose gel, containing calcium chloride, or copper nitrate, is pipetted, the fatty acids reaching the trap are precipitated in the form of insoluble soaps, and they remain there. This method is recommended both in the more accurate evaluation of dyslipidaemia cases and in the relationship between the increase of free fatty acids in the plasma and the lipolytic processes within the inflammatory syndromes (vasculitis, microvasculitis).

MÓDY J.: AGARÓZ GÉLELEKTROFORÉZISSEL NYERT LIPOPROTEIN-
FRAKCIÓK SZABAD ZSÍRSAV- ÉS TRIGLICERID-TARTALMANAK
KIMUTATÁSA



1. ábra: Szudán-feketével (1) és niluskék-szulfáttal előfestett szérum (2), szappanoldat (3), valamint szappanoldattal 1 : 6 (4) és 1 : 3 arányban kevert vérsavó (5) lipidogramja agaróz gélben, TRSI EDTA bórsav pufferoldatban. A lemezek anód felé eső végén vágott „csapdában” a zsírsavak oldhatatlan Cu-szappanok formájában kicsapódtak.



Fig. nr. 2