

A debreceni Orvostudományi Egyetem Bőr- és Nemikórtani Klinika¹ (igazgató: Nagy Endre dr. egyetemi tanár), Debreceni Orvostudományi Egyetem Kórélettani Intézet² (igazgató: Fächet József dr. egyetemi tanár) közleménye

Fibronectin szint meghatározás ELISA technikával monoklonális ellenanyagok felhasználásával progresszív szisztémás szklerózisban és morpheában

LADÁNYI ÉVA¹ dr., DEBRECZENI MARGIT¹ dr., KATONA ÉVA²,
POGÁNY ZSUZSA², ERDEI JÁNOS² dr., FACHET JÓZSEF² dr.

Összefoglalás: 20 morpheás és 7 progresszív szisztémás szklerózisos betegben szérumban fibronectin meghatározást végeztek. A kontrollok átlag értékéhez ($96,6 \pm 26,4 \mu\text{g/ml}$) viszonyítva a betegség mindkét csoportjában (morphea: $197,4 \pm 46,6 \mu\text{g/ml}$; progresszív szisztémás szklerózis: $187,0 \pm 27,3 \mu\text{g/ml}$) szignifikáns emelkedést mutatott a szérumban fibronectin szint. A mért értékek összefüggésben voltak a betegség súlyosságával.

Kulcsszavak: — progresszív szisztémás szklerózis — morphea — fibronectin

A szklerodermát az orvostudomány több mint 200 éve ismeri. A kórfolyamat a mai napig sem tisztázott [8, 9].

Az utóbbi években felgyorsult a kutatás a sejtfelszíni és az extracelluláris matrix proteinek analizisével kapcsolatban. Az extracelluláris matrix három fő komponense: a fibronectin, a kollagen és a glikozaminoglikánok.

A fibronectint először Morrison és mtsai izolálták 1948-ban a human plazma részlegesen tisztított frakciójából [5]. Immunológiai szerepével Ruoslahti és Vaheri foglalkozott [7]. A fibronectin biológiai szerepe sokrétű. Jelentősége kiemelt a celluláris adhézióban, a malignus transzformációban, a retikuloendotheliális rendszer funkciójában és az embrionális differenciálódásban többek között [3, 6, 7, 13]. A fibronectinnek két formája ismert: a sejtfelszíni és a plazma fibronectin. Ezek szerkezetileg nagyon hasonlóak, de nem azonosak [11]. A fibronectin in vivo funkciója még nem minden területen tisztázott. In vitro kísérletek szerint a plazma fibronectinnek nagy az affinitása a kollagénhez. Az egyes kollagén típusok közül a III-as típushoz a legnagyobb [3]. A fibronectin kötődését a kollagénhez elsősorban a szulfatált glikozaminoglikánok segítik elő. A glikozaminoglikánok egyaránt képesek kapcsolódni a plazma és sejtfelszíni fibronectinnel [13]. In vitro a glikozaminoglikánok képesek emelni vagy csökkenteni a plazma fibronectin kötődést a kollagénhez [12].

Szöveti fibronectin kimutatásáról (immunhisztokémiai módszerrel) több szerző beszámolt szklerodermában [2, 10]. SLE-ben és rheumatoid arthritisben plazma fibronectin szint meghatározást végeztek Cseh és mtsai 1986-ban [1]. Szklerodermában és morpheában nincs adat a plazma és szérumban fibronectin szintre vonatkozólag az irodalomban. Szklerodermában és morpheában szérumban fibronectin szintet mértünk 27 betegben.

Anyag és módszer

20 morpheás és 7 progresszív szisztémás szklerózisos betegben történt szérum fibronectin meghatározás. A betegek nem szerinti megoszlása: 19 nő és 8 férfi, életkoruk: 11—56 év. A betegség fennállása 1—10 év.

A human fibronectin mérése ELISA módszerrel, szendvics technikával történt. A módszer a DOTE Kórélettani Intézetben került kidolgozásra. A mérésnél felhasznált két ellenanyagot is itt állították elő. Az ellenanyagok poliklonális nyúl antihuman-fibronectin gamma globulin és monoklonális egér antihuman fibronectin gamma globulin voltak. A peroxidázzal jelzett poliklonális birka anti egér gamma globulin Serotech készítmény volt.

Vizsgálatainkban a meghatározni kívánt fibronectin volt az antigén. Első lépésben a poliklonális nyúl anti-human fibronectinnel érzékenyítettük a szilárd fázist, ehhez kötöttük az antigént. Ezután az egér antifibronectinnel kapcsoltuk, majd peroxidázzal jelzett anti-egér gamma globulint adtunk hozzá, végül orthofeniléndiamid szubsztátumot. Az enzim aktivitást a szubsztátát átalakulásával mértük. Az aktivitás nagysága arányos volt a vizsgálni kívánt antigén, jelen esetben a fibronectin mennyiségével.

Polystyren szövettenyésztő lemezt (Nunc 96-well plate, Denmark) érzékenyítettük lyukanként $50 \mu\text{l}$ $1 \mu\text{g/ml}$ -es koncentrációjú Nátrium carbonát pufferben ($0,1 \text{ M}$, pH : 9,6) oldott tisztított nyúl anti-human fibronectin gammaglobulinnal 16—20 órán át 37°C -on. Utána az érzékenyítés leállítása céljából 30 percig inkubáljuk ($100 \mu\text{l/lyuk}$) foszfát pufferrel (PBS: $0,01 \text{ M}$, pH : 7,2), mely tartalmaz $0,05\%$ Tween 20-at, $0,5\%$ BSA-t és $0,5 \text{ M}$ NaCl-ot.

Ezután $2\times$ mossuk PBS-Tween 20-al, majd $50 \mu\text{l}$ megfelelő hígítású fibronectin standardot, ill. plazma hígításokat ($3000\times$ hígítás) mérünk a mélyedésekbe, és 60 percig 37°C -on inkubáljuk. A hígító oldat: PBS Tween 20, $0,5 \text{ M}$ Na Cl, $0,5\%$ BSA.

$4\times$ mossuk a lemezt PBS-Tween 20-al, majd $50 \mu\text{l/lyuk}$ anti-human fibronectin gammaglobulin monoklonális ellenanyaggal inkubáljuk 60 percig 37°C -on. (Oldás PBS-Tween 20, $0,5 \text{ M}$ NaCl, $0,5\%$ BSA oldatban.)

Ismét mossuk a lemezt $4\times$ PBS-Tween 20-al és $50 \mu\text{l/lyuk}$ tormaperoxidázzal konjugált birka anti-egér gammaglobulinnal inkubáljuk 60 percig 37°C -on (oldás PBS-Tween 20, $0,5 \text{ M}$ NaCl, $0,5\%$ BSA oldatban).

Újra mossuk a lemezt $4\times$, majd $50 \mu\text{l/lyuk}$ szubsztátumot — $0,003 \text{ M}$ ortofenilén diamin, $0,3\%$ H_2O_2 citrát-foszfát pufferben ($0,075 \text{ M}$, pH : 5,0) — mérünk a mélyedésekbe, 30 percig szobahőmérsékleten sötét helyen állni hagyjuk, majd $50 \mu\text{l}$ $4\text{nH}_2\text{SO}_4$ -al leállítjuk a reakciót.

Az abszorbanciát 405 nanométeren mérjük.

Eredmények és megbeszélés

Irodalmi adatok szerint egészséges egyének plazma fibronectin koncentrációja 300 — $350 \mu\text{g/ml}$, szérumban a koncentráció 35 — 40% -kal alacsonyabb, $220 \mu\text{g/ml}$ [4].

Vizsgálatainkban saját kontroll értékhez viszonyítottuk, mely $96,6 \pm 26,4 \mu\text{g/ml}$ volt. A betegekben mért szérum fibronectin szint 112 — $286 \mu\text{g/ml}$ között volt. Az I. táblázatban a progresszív szisztémás szklerosisban mért értékeket adjuk meg, a II. táblázat a morpheás betegek értékeit mutatja.

A betegség súlyosságával összehasonlítva a szisztémás szklerózisos csoportban a szérum fibronectin átlag értéke alacsonyabb, mint a morpheás csoportban (III. táblázat).

Feltételezésünk az, hogy a fibrózissal, a mukopoliszacharida felszaporodással van összefüggésben a két betegség csoportban kapott egyéni és átlag érték változás. PSS-ben szenvedő betegekben a csökkent fibronectin szintézis mellett a fokozott fibronectin felhasználás is csökkent szérum fibronectin szintek kialakulásához vezethet.

Ezen vizsgálatok új eredményt szolgáltatottak arra vonatkozólag, hogy a szkleroderma betegség két csoportjában a szérum fibronectin szint a kontrollhoz viszonyítva a szignifikáns emelkedést mutat. A fibronectin szint követéses vizsgálatát fontosnak tartjuk, mert a betegség etiopatogenezisének tisztázásához, esetleg új kezelési eljárásához lehetőséget adhat.

So
1
2
3
4
5
6
7
So
Progr
scleros
Morph
Linea
Konti

I. táblázat

Szérum fibronectin meghatározás PSS-ben

Sorsz.	Életkor év	Nem	Betegség fenn- állási ideje év	Se fibronectin µg/ml
1.	29	♀	1	140
2.	50	♀	8	158
3.	46	♀	8	212
4.	56	♀	10	168
5.	48	♀	10	226
6.	47	♀	10	168
7.	49	♀	13	190

II. táblázat

Szérum fibronectin meghatározás morpheában

Sorsz.	Életkor év	Nem	Betegség fenn- állásának ideje év	Se fibronectin µg/ml
1.	16	♀	1	216
2.	32	♂	2	112
3.	38	♀	2	228
4.	11	♀	3	224
5.	35	♀	3	174
6.	47	♀	4	286
7.	19	♂	4	226
8.	44	♀	4	158
9.	53	♂	4	182
10.	12	♂	5	264
11.	17	♂	5	152
12.	15	♀	5	154
13.	44	♀	6	194
14.	50	♀	6	204
15.	36	♀	6	228
16.	40	♂	6	228
17.	49	♂	7	164
18.	20	♂	7	218
19.	18	♂	8	240
20.	19	♂	9	130

III. táblázat

Szérum fibronectin szint mérése
µg/ml

	n	$\bar{x} \pm sd$	minima- lis érték	maxi- malis
Progresszív szisztómás sclerosis	6	187,0 ± 27,3	158	226
Morphea	20	197,4 ± 46,6	112	286
Linearis scleroderma	1	174		
Kontroll	20	96,6 ± 26,4	40	130

IRODALOM: 1. Cseh, K. és mtsai: Magyar Belorv. Arch. 39, 14 (1986). — 2. Hiroyuki, N., Hiroaki, U., Takahiko, M.: Arch. Dermatol. 121, 995 (1985). — 3. Hörmann, H.: Derm. Wschr. 60, 1265 (1982). — 4. McCafferty, M. H. és mtsai: Pediatr. Res. 17, 482 (1983). — 5. Morrison, P. R., Edsall, J. T., Miller, S. g.: J. Am. Chem. Soc. 70, 3103 (1948). — 6. Ruoslahti, E. és mtsai: J. Inv. Derm. 79, 650 (1982). — 7. Ruoslahti, E., Vaheri, A.: J. Exp. Med. 141, 497 (1975). — 8. Sönnichsen, N.: Z. Hautkr. 60, 1829 (1985). — 9. Winkelmann, R. K.: Acta Derm. Vener. 91, 788 (1976). — 10. Ze-Yi, Chen és mtsai: Acta Dermato Vener. (Stockholm) 65, 185 (1985). — 11. Yamada, K. M. és mtsai: J. Cell Biol. 80, 492 (1979). — 12. Yamada, K. M. és mtsai: J. Biol. Chem. 255, 6055 (1980). — 13. Yamada, K. M., Olden, K.: Nature 275, 179 (1978).

Érkezett: 1986. VIII. 22.

Közlésre elfogadva: 1986. X. 30.

З. Ладани, М. Дебрецени, З. Катона, Ж. Погань, Й. Эрдеи, Й. Фачет: *Определение уровня фибронектина техникой ELISA применением моноклональных антигенов при прогрессирующем системном склерозе и морфее*

Авторы у 20 больных страдающих морфеей, у 7 прогрессирующим системным склерозом определяли уровень фибронектина. По сравнению с средними значениями контрольных (96,6 ± 26,4 мкг/мл) в обеих группах больных (морфея: 197,4 ± 46,6 мкг/мл); прогрессирующий системный склероз: (180,0 ± 27,3 мкг/мл) уровень фибронектина в сыворотке показал достоверное повышение. Измеренные значения имели связь с тяжестью заболевания.

Ladányi, É., Debreczeni, M., Katona, É., Pogány, Zs., Erdei, J., Facher, J.: *Determination of fibronectin level with ELISA method using monoclonal antibodies in PSS and morphea*

Serum fibronectin levels were determined in 20 patients suffering from morphea and 7 with PSS. As compared to the average value of controls (96,6 ± 26,4 µg/ml) in both groups (morphea: 197,4 ± 46,6 µg/ml; PSS: 187,0 ± 27,3 µg/ml) the serum fibronectin levels were increased significantly. The measured values were correlated to the severity of the illness.

Ladányi, E., Debreczeni, M., Katona, E., Pogány, Z., Erdei, J. und Facher, J.: *Fibronektinbestimmungen mit der ELISA-Technik unter Verwendung monoklonaler Antikörper bei der progressiven Systemsklerose und bei der Morphea*

Bei 20 Morphea und 7 Patienten mit progressiver Sklerodermie wurde im Serum Fibronektin bestimmt. Im Vergleich zu den Kontrollwerten (96,6 ± 46,6 µg/ml) wurde bei beiden Erkrankungen (Morphea: 197,4 ± 46,6 µg/ml; progressive Sklerodermie: 187,0 ± 27,3 µg/ml) eine signifikante Erhöhung des Serumfibronektins nachgewiesen. Die gemessenen Werte standen im Zusammenhang mit der Schwere der Erkrankung.