

Baza de cercetări științifice a Academiei R.P.R., filiala Tg.-Mureș (cond.: prof. M. Gündisch, doctor în științe medicale), Catedra de chimie-fizică (cond.: șef de lucrări B. Barabás) și Catedra de farmacologie (cond.: conf. Gh. Feszt) ale I.M.F. Tg.-Mureș

CERCETĂRI REFERITOARE LA BAZELE FIZICO-CHIMICE ALE PROBEI CU ROȘU DE CONGO (RC)

Șt. Csögör, B. Tökés, B. Pálffy

Explicația mecanismului de dispariție a coloranților coloidalii injectați intra-venos (iv) sau intradermic (id) are o deosebită importanță teoretică și practică. Numeroase metode de cercetare și de diagnostic clinic se bazează pe determinarea eliminării coloranților. Pentru aprecierea funcției cromopexice a sistemului reticulo-histiocitar (SRH) *Adler* și *Reimann* (2) au propus, încă în anul 1925, examinarea ritmului de dispariție a colorantului RC injectat iv. În 1936, *Midy* (14) considera că proba *Adler* și *Reimann* este una din metodele de bază, folosite la om pentru studiul stării funcționale a SRH. Deși valoarea acestei probe a fost contestată de mai mulți autori (6, 9, 13, 15, 23), ea face parte și la ora actuală din bateria de teste funcționale ale SRH (1, 20).

Bennhold (3, 4, 5) a dovedit că dispariția RC din torrentul circulator este accelerată atunci când în organism există o substanță cu afinitate deosebită față de colorant (amiloid) sau atunci când vehicolul albuminic din sânge este micșorat. În studiul funcției de transport a proteinelor, *Bennhold* a folosit metoda cu RC drept model, deoarece acest colorant este strâns legat de albumină. („Das Kongorot ist fest an das Albumin gebunden“).

Studiul eliminării RC injectat id se folosește în diagnosticul amiloidozei cutanate (18, 19). Cercetarea dispersării coloranților în țesutul conjunctiv al cozii de șobolan servește ca bază în unele procedee de dozare a hialuronidazei (29). Prin măsurarea dispersării RC și a altor coloranți, *Năstase* și colab. (16) au studiat permeabilitatea substanței fundamentale a țesutului conjunctiv și acțiunea de accelerare a hialuronidazei asupra difuziunii coloranților. Proba *Kavetzky*, folosită pentru aprecierea stării funcționale a SRH, se bazează pe determinarea extinderii, în țesutul conjunctiv subcutanat, a albastrului de tripan injectat id.

RC sintetizat de *Böttiger* în 1884, este un reprezentant al derivaților benzinici, având greutatea moleculară de 696,66, raza moleculei de 1,8 m μ , cu formula din fig. nr. 1.

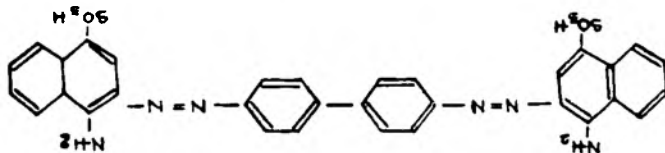


Fig. nr. 1: Formula structurală a RC.

În 1909, Sørensen (27) a presupus că RC se leagă de proteinele serice. Raku-sin (22), în 1928, a arătat că acest colorant se leagă de ovalbuminele denaturate termic și a considerat că această legătură este de natură chimică. Heilmeyer (12) a demonstrat, în 1929, că spectrul de absorbție a RC legat de proteine diferă de cel al colorantului liber și că acest fapt are aplicație practică în determinarea volumului plasmatic. Spectrul diferit de absorbție al colorantului legat de pro-teine plasmatică denotă existența unei legături între colorant și proteinele plas-matice. Pe baza unor cercetări din domeniul cineticii de reacție, Haurowitz și colab. (11) au constatat că între RC și albuminele plasmatică umane, su-puse denaturării termice la 65—75°C, are loc un proces de adsorbție. Ei au de-mostrat că această interacțiune este mai puternică decât cea dintre colorant și proteinele native. Dieryck (9) a observat că concentrația plasmatică a RC este mai mare decât cea serică, fapt cauzat de fixarea unei cantități de colorant de fibrina cheagului. Conform datelor lui Rusznyák și colab. (24) o moleculă de albumină leagă circa 16 molecule de colorant.

Pentru aprofundarea cunoștințelor noastre referitoare la mecanismul probei cu RC ne-am propus în lucrarea de față:

- să examinăm caracterul legăturii dintre RC și proteinele plasmatică;
- să cercetăm influența exercitată de proteinele plasmatică asupra difu-ziunii RC.

Metodă și rezultate

Natura legăturii dintre coloranți și proteinele plasmatică se poate studia prin studiu spectral de absorbție al colorantului. Spectrul moleculelor fixate diferă de spectrul moleculelor libere. Măsura deplasării ne orientează asupra mărimii forțelor de interacțiune. Am studiat deplasarea spectrului de absorbție a soluției de RC + ser + apă, comparativ cu spectrul soluției apoase a RC. Determinările le-am efectuat cu spectrometrul C. Zeiss, Jena și cu spectrofotometrul Beckman DK-2. După adăugarea serului, am constatat o deplasare a benzilor de absorbție spre lungimile de undă mai lungi (15—25 m μ). Bazându-ne pe aceste date, am executat calcule aproximative, obținând drept energie de legătură dintre RC și proteinele plasmatică o valoare de cca 2—2,5 Cal/mol.

Pentru a obține date privitoare la difuziunea colorantului, am executat deter-minări prin electroforeză pe hirtie și analiză capilară (21). Conform așteptărilor noastre, am observat că RC, deși conține sarcini electrice cu intervalul de viraj între pH 3,0—5,2, rămâne fixat pe hirtia de electroforeză la nivelul liniei de start. Acest fenomen se observă chiar atunci când proba conține și ser; protei-nele se deplasează în direcția corespunzătoare condițiilor de experiență, iar RC rămâne pe linia de start. Acest fapt este un indiciu calitativ, care demonstrează că colorantul se leagă mai puternic de celuloză decât de proteinele plasmatică.

Pentru a examina forța de legătură a RC față de materia hirtiei în funcție de tăria ionică, $I = \frac{1}{2} \sum c_i \cdot z_i^2$, am efectuat analiza capilară pe hirtie Whatman nr. 4. Pentru aceste experiențe, am pregătit diferite soluții conținând fiecare RC 0,1% și electroliți (NaCl respectiv o soluție tampon medinal-veronal pH 7,8) de concentrații diferite, cu sau fără ser. Tăria ionică crescând favorizează fixarea RC pe hirtie (fig. nr. 2).

Din fig. 2 reiese că frontul colorantului se ridică la o înălțime cu atât mai mică, respectiv diferența dintre înălțimea frontului de solvent și de colorant este cu atât mai mare, cu cât tăria ionică a soluției este mai mare. Practic, nivelul frontu-lui nu depinde de natura electrolitului.

În prezența serului, înălțimea frontului de colorant depășește apreciabil înăl-țimea atinsă a frontului la celelalte probe, conținând electroliți fără prote:ne.

În continuare, am observat un paralelism, în aparatul lui Nernst, între va-riațiile înălțimii frontului de colorant la analiză capilară și mobilitatea electrofo-retică în funcție de tăria ionică. Este cunoscut faptul că mobilitatea soluțiilor

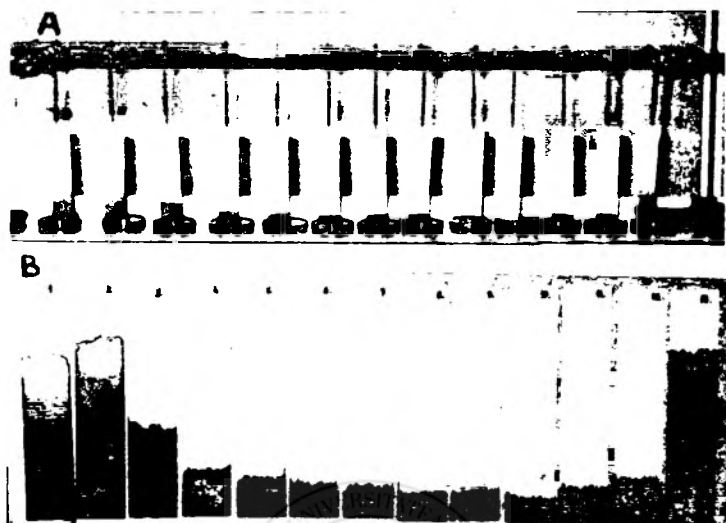


Fig. nr. 2: Corelația dintre ridicarea capilară a RC și forța ionică a soluției. 1) I NaCl = 0,085 cu ser; 2) I NaCl = 0,000 cu ser; 3) I NaCl = 0,000; 4) I NaCl = 0,017; 5) I NaCl = 0,042; 6) I NaCl = 0,085; 7) I NaCl = 0,171; 8) I NaCl = 0,342; 9) I NaCl = 0,684; 10) I NaCl = 1,368; 11) I NaCl = 0,085; I tampon = 0,085; I NaCl + I tampon 0,170; 12) I tampon = 0,085; 13) I tampon = 0,085 cu ser. A: în timpul analizei, B: după uscarea benzilor.

IN VITRO IN VIVO

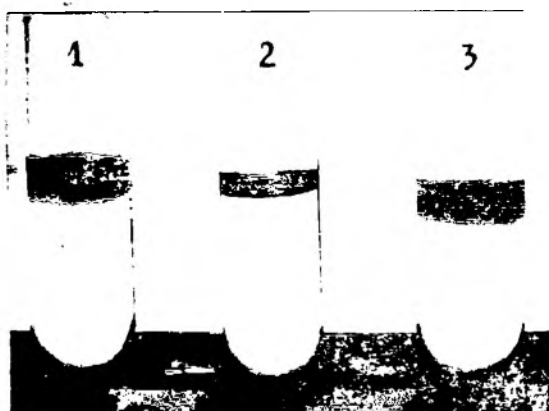


Fig. nr. 3: Difuziunea RC în gelatină 2%. Eprubeta 1: RC 1% + ser (1:1), 2: RC 1% + NaCl 0,5% (1:1), 3: RC 1% + NaCl 0,5% + ser (0,1:0,9:1,0).



Fig. nr. 4: Analiza capilară a RC excretat de ficat (in vivo) și a colorantului adăugat in vitro plasmei (in vitro).

coloidale și potențialul lor electrocinetic (21) scade odată cu creșterea tăriei ionice a mediului de dispersie. În cazul RC, lucrând cu diferite concentrații de NaCl, am obținut rezultatele trecute în tabelul I.

Tabelul I.

Concentrația RC ‰	Tăria ionică a mediului (val)	Mobilitatea RC (cm ² sec ⁻¹ volt ⁻¹)	Potențialul ζ (mv)
0,1	0,02	13.10 ⁻⁵	-27,5
0,1	0,20	4.10 ⁻⁵	- 8,5
0,1	1,00	2,5.10 ⁻⁵	- 5,0
0,1	2,00	1.10 ⁻⁵	- 2,0

Pentru cercetarea difuziunii colorantului în mediul, care conține proteine fixe, precum și a influenței exercitate de legătura RC și proteinele plasmatice, am studiat difuziunea colorantului în coloană de gelatină 1% dizolvată în apă distilată, în diferite condiții de experiență (fig. nr. 3).

Se poate observa că adăugarea electrolitului frânează difuziunea colorantului (eprubeta nr. 2), deplasând echilibrul de repartiție în direcția gelatinei. În același timp, un adaos de ser la soluția de cercetat favorizează difuziunea chiar și în prezența aceleiași cantități de electrolit (eprubeta nr. 1 și 3). O interdependență similară poate să aibă loc și in vivo, în funcție de raportul dintre tăria ionică și conținutul în proteine al lichidului interstițial.

Pentru a obține date referitoare la rolul ficatului în excreția RC, am efectuat analiza capilară a colorantului eliminat de ficat și a RC adăugat bilei in vitro. În ambele cazuri pigmentii biliari și RC s-au separat net. Primul s-a ridicat împreună cu frontul solventului, iar cel din urmă a rămas practic la linia de start (fig. nr. 4).

Discuții

Valoarea aproximativă a energiei de legătură dintre RC și proteinele plasmatice, calculată din datele spectrofotometrice (2,0—2,5 Cal/mol) denotă, în concordanță cu rezultatele lui *Haurowitz* și colab., că forțele de legătură sînt de tipul forțelor Van der Waals și de tipul legăturilor de hidrogen.

Într-o altă lucrare (8), am arătat că adăugarea plasmei la RC inhibă într-o oarecare măsură fixarea acestuia de țesuturi, fapt, care împreună cu posibilitatea eluării plasmatice a colorantului din piele, ne arată că ordinul de mărime al forțelor de legătură dintre colorant și elementele tisulare este aproximativ același ca și cel dintre proteinele plasmatice și colorant; colorantul are deci o capacitate de adsorbție față de plasmă, asemănătoare cu cea față de piesele histologice.

Importanța interacțiunii dintre RC și proteinele plasmatice în fenomenele de difuziune s-a manifestat și în experiențele de capilarizare. Aceste experiențe ne-au arătat că în prezența serului înălțimea frontului de colorant depășește apreciabil înălțimea fronturilor observate la celelalte probe, care conțin electroliti dar nu conțin proteine. Acest fenomen se explică prin faptul că RC se leagă de proteine și cu toate că tăria acestei legături este mai mică decît cea cu celuloza, ridicarea ei capilară în prezența serului devine posibilă. Caracterul de difuziune al ridicării capilare este indicat de faptul că intensitatea culorii RC pe hîrtie descrește treptat, spre deosebire de probele lipsite de proteine, unde variația intensității de culoare apare brusc.

Faptul că în prezența electroliților RC nu se ridică împreună cu frontul solventului și deci nu satisface regula lui *Coehn*, se poate explica prin scăderea solubilității colorantului în apă, în aceste condiții. Concentrându-se, moleculele lui formează agregate mai mari, de greutate moleculară de 8—9.000 (28), fapt care deplasează echilibrul de repartitie dintre faza mobilă și imobilă în direcția suprafeței de celuloză. Coroborând aceste observații cu faptul că soluția de RC 0,1% coagulează la adăugarea NaCl 8%, iar în prezența serului în diluție de $\frac{1}{5}$ coagularea nu are loc nici în concentrația electrolitului de 20%, presupunem că proteinele joacă rolul coloidului protector. Cu toate că colorantul învelit de proteine are un potențial de $\zeta = -20$ mV la $I=0,02$ val, adică redus față de potențialul particulelor de colorant liber ($\zeta = -30$ mV), hidrofilia lui accentuată prin stratul protector îi asigură o stabilitate crescută. În cazul analizei capilare, proteinele care învelesc moleculele de RC reduc interacțiunea (forțele de legătură) dintre colorant și celuloză.

Metoda folosită în experiențele noastre referitoare la difuziunea RC în coloana de gelatină diferă de cea descrisă de *Bennhold*, *Rusznayák* și colab. prin faptul că noi am utilizat un gel de o concentrație mai mică (1% față de 5% din metoda lui *Bennhold*) folosind drept solvent apă distilată și nu soluție de tampon pH 7,4. Aceste condiții favorizează difuziunea colorantului. Astfel nu trebuie să ne mire faptul că am putut constata pătrunderea colorantului în coloana de gelatină, fenomen care nu a fost observat în experiențele autorilor citați. Prezența proteinelor plasmatice în experiențele de difuziune în coloane de gelatină facilitează difuziunea colorantului, la fel ca în cazul analizei capilare.

Facilitarea difuziunii coloranților cauzată de injecția concomitentă a soluțiilor proteice, fenomen cercetat in vivo de *Rusznayák* și colab se poate explica deasemenea prin procesele de adsorbție-desorbție care au loc între elementele structurale fixe ale țesutului conjunctiv și substanțele coloidale, respectiv colorantul. Adăugarea serului la soluția de colorant injectat, modifică echilibrul de adsorbție în favoarea adsorbantilor mobili din lichidul interstițial, favorizând astfel procesul de difuziune. Considerăm că un mecanism similar stă și la baza accelerării, în prezența proteinelor, a resorbției RC din cavitatea peritoneală și pleurală, fenomen descris de *Rusznayák* și colab. de *Courtice* și colab. (7).

Împreună cu *Schubert* (25, 26) și *Weese* și *Scholtan* (30), considerăm că fenomenele de adsorbție și eluție, care au loc între proteinele plasmatice din lichidul interstițial și proteinele fixe ale fibrelor conjunctive, precum și cele celulare, joacă un rol important în îndepărtarea coloranților injectați în țesuturi. Acest proces este reprezentat schematic în fig. 5.

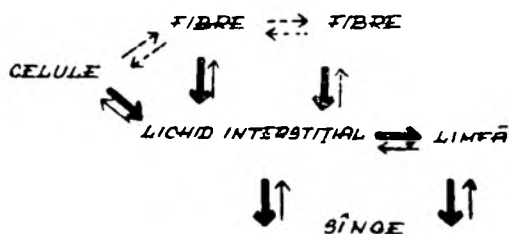


Fig. nr. 5: Schema mecanismului de dispariție a colorantului din piele

Dispariția colorantului în cazul probei id cu RC se împarte în două etape. Prima fază, de durată scurtă, este dominată de dispariția rapidă a colorantului liber sau adsorbit de proteinele plasmatice ale lichidului interstițial, prin difuziune și circulația limfatică, respectiv adsorbția pe elementele structurale fixe ale

țesutului conjunctiv. În faza a doua, mult mai lungă decît prima, are loc eluarea și îndepărtarea colorantului adsorbit în prealabil de elementele tisulare fixe.

Așa cum reiese din datele bibliografice și din experiențele prezentate în această lucrare, rolul proteinelor plasmatiche de eluare și îndepărtare a coloranților fixați de țesuturi, ni se pare important pentru că denotă o activitate de epurare care seamănă între altele, de ex. cu transportul bine cunoscut al metaboliților hemoglobinei și care poate avea o importanță deosebită în funcțiunile metabolice normale sau patologice ale organismului.

Concluzii

Pe baza datelor bibliografice și a cercetărilor proprii considerăm că eliminarea din sînge sau din piele a RC este determinată de următorii factori:

— Raportul dintre forțele care determină echilibrul de adsorbție al colorantului (capacitatea proteinelor plasmatiche și a elementelor tisulare de a fixa fizico-chimic colorantul).

— Factorii care determină dinamica schimburilor de substanțe dintre proteinele plasmatiche și elementele tisulare, și viteza stabilirii echilibrului de adsorbție al colorantului (viteza schimburilor de substanțe dintre sînge și lichidul interstițial; permeabilitatea țesutului conjunctiv; viteza schimburilor de substanțe dintre lichidul interstițial și limfă, viteza circulației limfatice).

— Funcția cromopexică a sistemului reticulo-histiocitar.

— Capacitatea ficatului de a elimina colorantul.

— Eliminarea colorantului prin rinichi (numai în cazul tulburării funcțiilor renale).

Interpretarea rezultatelor obținute pînă în prezent cu proba cu RC a fost în majoritatea cazurilor simplistă sau chiar eronată, deoarece rezultatul obținut s-a atribuit uneia sau cel mult cîtorva factori care influențează rezultatul probei (funcția cromopexică a sistemului reticulo-histiocitar, permeabilitatea capilară etc.), neglijînd rolul și importanța celorlalți factori.

Credem că efectuarea concomitentă a probei cu RC cu testele de permeabilitate capilară, cercetarea dispersiunii în țesutul conjunctiv a unor substanțe care nu se leagă nici de elementele tisulare și nici de proteinele plasmatiche, determinarea vitezei circulației limfatice, examinarea funcțiilor hepatice, aprecierea capacității proteinelor plasmatiche de a lega colorantul, deschide perspective noi nu numai în studiul cromopexiei dar și în înțelegerea mai aprofundată a schimburilor de substanțe dintre sînge și țesuturi.

Sosit la redacție: 6 aprilie 1965.

Bibliografie

1. ABURAYA T., KAWAGUCHI O., SAKIKAWA C.: Tokushima J. exp. Med. (1961), 7, 219; 2. ADLER H., REIMANN F.: Z. exper. Med. (1925), 47, 617; 3. BENNHOLD H.: Dtsch. Arch. klin. Med. (1923), 142, 32; 4. BENNHOLD H.: Klin. Wschr. (1963), 41, 109; 5. BENNHOLD H., OTT H., SCHEURLEN P. G.: Proceedings of the VII-th congress of the European Society of Haematology. Ed.: S. Karger Basel-New York (1962); 6. BENNHOLD H., OTT H.: Handbuch der Allgemeinen Pathologie, Fünfter Band. Erster Teil. Springer-Verlag Berlin-Göttingen-Heidelberg (1961); 7. COURTICE F. C., SIMMONDS W. J.: J. Physiol (London) (1949), 109, 117; 8. CSÖGOR ȘT., PÁLFFY B., TÖKÉS B.: Med. Internă (1964), 16, 851; 9. DIERYCK J.: cit. Carnot P., Cachera R., T. Melik-Oganjanoff: C. R. Soc. Biol. Paris, (1937), 124, 938; 10. GEORGESCU P., PAUNESCU E.: Metode biochimice de diagnostic și cercetare. Ed. Medicală, București, 1960; 11. HAUROWITZ F., DI MOIRA F., TEKMAN S.: J. Amer. chem. Soc. (1952), 74, 2265; 12. HEILMEYER L.: Bioch. Z. (1929), 212, 430; 13. KELEMEN L., CSÖGOR ȘT.: Rev. Medicală (1961), 7, 183; 14. MIDY R. M.: Le conjonctif histiocytaire. Ed. Masson, Paris (1936); 15. MORAIS E.: C. R. Soc. Biol. Paris (1935), 118, 1512; 16. NĂSTASE GH., CARNIOL M., ALEXANDRESCU-PURICE A., TRANDAFIRESCU M.: Rev.

Med. chir. (1962), 66, 583; 17. NENIȚESCU C. D.: *Tratat elementar de chimie organică*. Imprimeria C.F.R. București, 1947; 18. NOMLAND N.: *Arch. Derm. Syph. (Berl.)* (1936), 33, 85; 19. PHILPOTT, FRESHMAN: *Arch. Derm. Syph. (Berl.)* (1936), 33, 970; 20. PUSKÁS GY., BALÁZS G., LISZKA P., NUSSBAUM V.: *Rev. Medicală* (1963), 9, 121; 21. PUTILOVA I. N.: *Lucrări practice de chimie coloidală*. Traducere. Ed. Tehnică. București (1954); 22. RAKUSIN M. A.: *Biochem. Z.* (1928), 192, 168; 23. REDING R.: *C. R. Soc. Biol. Paris* (1936), 123, 1236; 24. RUSZNYÁK I., FÖLDI M., SZABÓ GY.: *A nyirokkeringés élet- és kortana*. Akadémiai Kiadó, Budapest (1955); 25. SCHUBERT R.: *Dtsch. Med. Wschr.* (1951), 76, 1487; 26. SCHUBERT R.: *Dtsch. Med. Wschr.* (1949), 74, 1489; 27. SÖRENSEN S.P.L.: *Biochem. Z.* 1909, 21, 200; 28. SVEDBERG: cit. Rusznyák I. și col. (24); 29. SZPORNÝ L.: *Kisérl. Orvostud.* (1957), 9, 465; 30. WEESE H., SCHOLTAN W.: *Dtsch. Med. Wschr.* (1951), 76, 1492.