

Catedra de fiziologie a I.M.F. din Tg.-Mureș (cond.: conf. Gh. Arsenescu)
și Baza de cercetări științifice a Academiei R.P.R. (cond.: prof. M. Gündisch,
doctor în științe medicale)

APARAT PENTRU ULTRAFILTRAREA LICHIDELOR BIOLOGICE MACROMOLECULARE

E. Mody, M. Kerekes

Concentrarea lichidelor biologice cu un conținut redus de proteine, respectiv alte substanțe macromoleculare (polizaharide, acizi nucleici, peptide — 7, 8, 11, 14, 17, 18, 21) reprezintă o problemă deosebit de importantă în cercetările din domeniul biochimiei moderne. Majoritatea metodelor utilizate în acest scop sînt însă greoaie și neexpeditiv sau necesită o aparatură complicată și costisitoare, ca de ex. liofilizarea sau criodializa (21). Pe lângă acestea, în cursul operațiunilor necesare la unele din aceste metode, ca de ex. precipitarea prealabilă cu solvenți organici la rece (2), are loc și o denaturare a substanțelor proteice. În majoritatea cazurilor ultrafiltratul lipsit de substanțe macromoleculare nu poate fi recuperat, fiind eliminat în cursul concentrării. Alte metode prescriu întrebuințarea unor membrane comerciale speciale sau substanțe de bază pentru prepararea acestora, care nu sînt accesibile la noi în țară (1, 3—6, 9, 10, 12, 13, 15, 16, 19, 20).

Pe baza acestor considerente ne-am propus proiectarea și construirea unui aparat simplu, ușor de mînuit, care în același timp asigură condiții optime (constanța dimensiunii porilor membranei, a presiunii și a temperaturii) și face posibilă recuperarea și a ultrafiltratului lipsit de substanțe macromoleculare.

Descrierea instalației de ultrafiltrare

Instalația se compune din 3 piese mai importante (fig 1); cifrele din paranteză reprezintă numerotarea din figuri:

a) un bac (5) în care sînt așezate 6 vase (1) pentru ultrafiltrare și care asigură menținerea temperaturii lichidului introdus în membranele (4) la valoarea constantă prin circulația apei cu temperatura dorită. Circulația apei se asigură prin cele două tuburi laterale (8), acestea fiind puse în legătură cu un ultratermostat Hoepler sau de alt tip; b) un vas de siguranță (13), confecționat dintr-o sticlă Wulff, cu trei orificii, și c) manometru cu mercur (20), prevăzut cu un robinet (17) și cu un regulator de presiune (14), confecționat dintr-o pipetă Pasteur, fixată la capătul superior cu ajutorul unei bucăți inelare de tub de cauciuc (15), și recuplată la sistemul de vid (23, 24).

a) Bacul este confecționat din plăci de plexiglas cu dimensiunile indicate în figurile 1 și 2. Partea închisă (5) servește ca recipient pentru vasele de ultrafiltrare (1) și pentru lichidul de răcire, iar părțile laterale proeminente (6) asigură stabilitatea aparatului, rezemarea tuburilor laterale și a tubului colector (12). Placa de acoperire (2), de dimensiunile indicate în figura 2, este prevăzută cu orificiile (9) pentru primirea vaselor de ultrafiltrare, respectiv a robinetelor (10) acestora. Imobilizarea vaselor este asigurată prin piesele fixatoare, lipite față în față de pereții interiori ai bacului (7) din fig. 1 și 3. Bara (21) din fig. 1 servește pentru imobilizarea tubului colector, fiind prinsă cu două arcuri lamelare de suport (22).

E. MÓDY, M. KERÉKES: APARAT
PENTRU ULTRAFILTRAREA LICHIDELOR BIOLOGICE MACROMOLECULARE

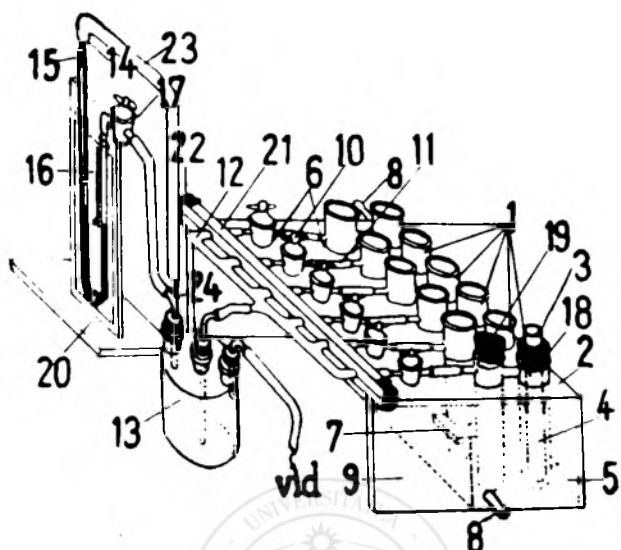


Fig. nr. 1.: Aparatul de ultrafiltrare (explicație în text).

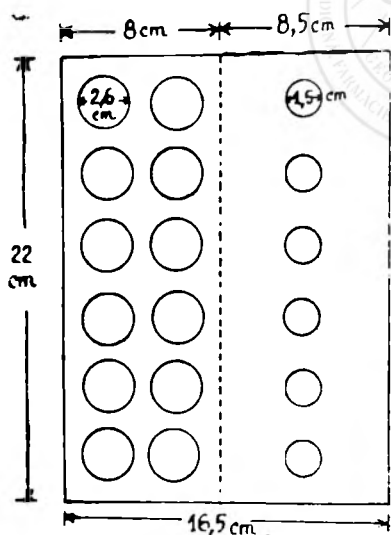


Fig. nr. 2.: Schița capacului bacului (explicație în text).

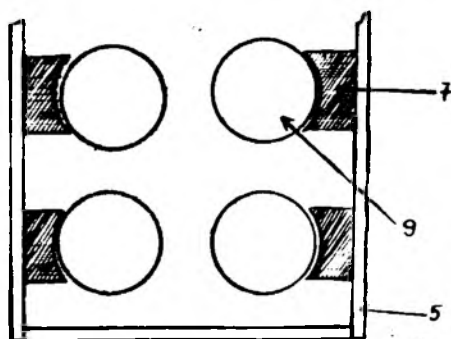


Fig. nr. 3.: Aplicarea pieselor fixatoare în interiorul bacului (explicație în text).

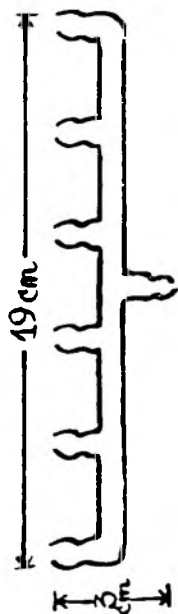


Fig. nr. 4.: Tubul cnlector.

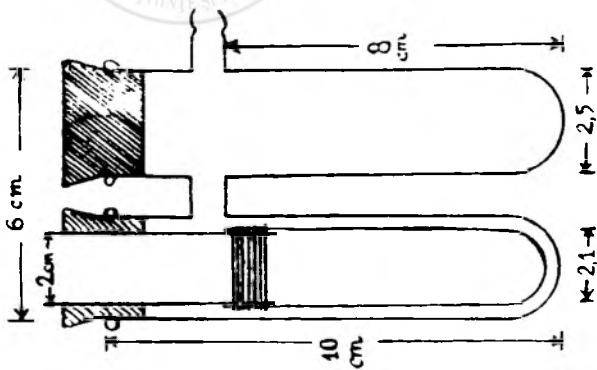


Fig. nr. 5.: Vasele duble de ultrafiltrare

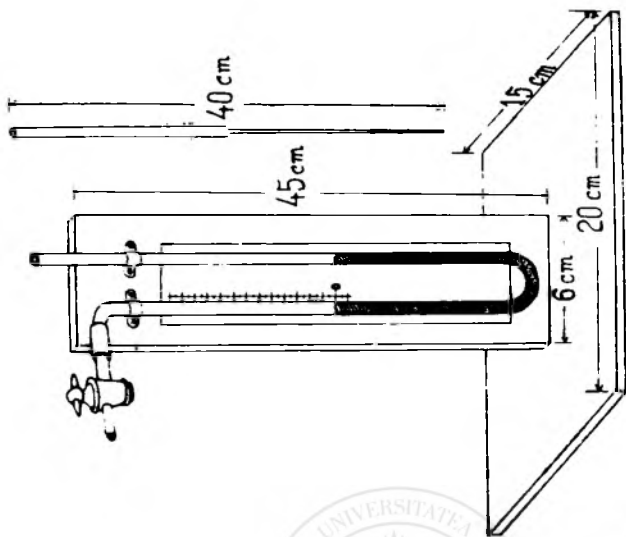


Fig. nr. 6.: Manometrul cu regulator de presiune (explicatie in text).



Vasele pentru ultrafiltrare sînt confecționate din sticlă, avînd dimensiunile indicate în fig. 5. Vasul este compus din două tuburi de sticlă („a” și „b”), închise la un capăt și care comunică între ele. În primul tub („a”) se introduce membrana de colodiu în formă de săculeț, fixată pe un tub de sticlă (3) care trece prin orificiul unui dop de cauciuc găurit (18) (confecționarea membranei vezi mai jos). Celălalt tub („b”), închis cu un dop de cauciuc neperforat (19), servește pentru recoltarea ultrafiltratului lipsit de substanțele macromoleculare. Comunicarea cu pompa de vid se realizează pentru fiecare vas aparte, acestea comunicînd cu tubul colector (12 din fig. 1 și „b” din fig. 4) prin intermediul unui robinet (10 din fig. 1). Legăturile se fac cu ajutorul unor bucăți de tub de cauciuc (fig. 5).

b) *Vasul de siguranță* (13 din fig. 1) este o sticlă Wulff de aprox. 1 litru capacitate, cu trei orificii care comunică cu tubul colector (12), cu manometrul (20), resp. cu ventilregulatorul (13) și cu pompa de vid.

c) *Manometrul cu ventilul* (fig. 6) în formă de „U” este confecționat dintr-un tub de sticlă și montat pe un stativ de plexiglas cu dimensiunile indicate în figură. În partea robinetului se aplică lîngă tub o scală gradată în centimetri (16), de la 0 pînă la 17, luînd în considerare că presiunea reală corespunde în realitate unei valori duble. Ventilul constă dintr-o pipetă Pasteur (14) cu diametrul exterior de cca. 0,6 cm, care se introduce în orificiul superior liber al manometrului, fiind fixat de acesta printr-un inel din tub de cauciuc (15). Prin intermediul unui tub de cauciuc (23) și al unui tub în formă de „T” (24), capătul superior al capilarului comunică cu orificiul pentru manometru al vasului de siguranță (13). Capătul inferior al capilarului se introduce sub nivelul mercurului pînă la valoarea dorită de presiune negativă, indicată pe scala opusă. În urma vidului aplicat, nivelul mercurului (deci nivelul presiunii negative) va fi menținut constant la această valoare (fig. 6).

Confecționarea membranelor

Se prepară următoarea soluție:

Proceloidină „Geigy”	7 g
Eter etilic comercial	65 ml
Alcool etilic 9% comercial	35 ml
Apă distilată	2 ml

Soluția trebuie ținută la întuneric, într-un recipient închis și perfect etanș. Se ia un tub de sticlă închis la un capăt, lung de 10 cm și cu calibrul de 1,5 cm, se curăță în mod obișnuit și se usucă. Se umple tubul cu soluția de mai sus, aceasta fiind turnată imediat înapoi în sticlă, apoi, ținînd tubul orizontal, îl învîrtim timp de 2 minute în așa fel, ca soluția rămasă în tub să se întindă pe peretele interior în mod uniform. Apoi se trece în jurul tubului un dop de cauciuc perforat, cu ajutorul căruia tubul se așează peste orificiul de pe gaura plăcii de porțelan dintr-un exicator cu robinet. Se închide exicatorul și se lasă să stea timp de 1 minut. După aceea se leagă exicatorul cu pompa de vid, provocînd vid timp de 3 minute și 20 secunde. Se scoate apoi tubul și se umple cu apă distilată, schimbînd-o după 3 minute; schimbarea apei se repetă încă de două ori. Membrana se desparte apoi de sticlă jur-împrejur cu ajutorul unui bisturiu și se toarnă apă între ea și peretele tubului, manevră care ușurează dezlipirea și scoaterea ei. Membrana trebuie să fie perfect transparentă și lipsită de bule. Dacă devine albă sau buloasă, nu poate fi întrebuițată.

După scoaterea din tub, membrana se pune imediat într-un vas cu apă distilată. Se taie porțiunea neregulată de la capătul deschis și se trage pe tubul suport de care se leagă strîns cu ață, conform fig. 5. Membranele trebuie păstrate totdeauna umplute cu apă distilată, atîrnîndu-le într-un vas cu apă, deoarece în caz de uscare la aer liber ele își pierd complet permeabilitatea și elasticitatea.

Membranele astfel confecționate sînt utilizabile timp de mai multe luni, asigurînd ultrafiltrarea a cca. 4 ml de lichid în 60 minute, menținîndu-se mărimea porilor.

Minuirea aparatului

După montarea instalației se conectează ultratermostatul, pornind circularea apei de răcire. Apoi se așează o cantitate corespunzătoare de apă distilată, resp. soluție tampon sau ser fiziologic în primul tub („a” din fig. 5) și se introduce membrana, în care s-a așezat soluția care trebuie supusă ultrafiltrării. Celălalt tub („b”) se astupă bine cu un dop de cauciuc, rămânând deocamdată gol. După prăgătirea tuturor membranelor necesare se deschide pompa de vid, iar ventilul se reglează prin fixarea corespunzătoare a pipetei Pasteur în așa fel, încât presiunea negativă indicată de manometru să se mențină în mod constant între 15—17 cm, ceea ce corespunde unui vid de 300—340 mm Hg. După concentrarea la volumul dorit — ceea ce se observă prin peretele transparent — se închide robinetul vasului respectiv, scoțându-se membrana. Concentratul macromolecular se aspiră din interiorul membranei cu ajutorul unei micropipete și se prelucrează imediat sau se păstrează la frigider până la prelucrare. Ultrafiltratul conținut în cele două vase se aspiră cu ajutorul unei pipete mai mari și se colectează pentru prelucrare într-un vas corespunzător.

Aparatura descrisă prezintă următoarele avantaje:

- se confecționează ușor;
- asigură condiții standard perfect reproductibile și evită denaturarea substanțelor;
- asigură obținerea atât a concentratului macromolecular, cât și a ultrafiltratului;
- metoda poate fi folosită pentru scopuri multiple: concentrarea lichidului cefalo-rahidian, a limfei, a urinei, a transudatelor și a exsudatelor, a extractelor tisulare, a culturilor de microbi și virusuri etc., în vederea efectuării unui șir întreg de analize (electroforeză, cromatografie, ultracentrifugare, microscopie electronică etc.).

Concluzii

Folosind săculețe confecționate din celoidină cu pori standardizați, cu ajutorul unui bac din plexiglas cu răcire, precum și al unor recipiente duble, aparatul proiectat asigură, pe lângă ultrafiltrarea de scurtă durată, izotermă și izobară, și obținerea cantitativă atât a concentratului macromolecular, cât și a ultrafiltratului.

Sosit la redacție: 2 martie 1965.

Bibliografie

1. BARRETO P.C.R., MANO D.B.: J. Chromatogr. (1962), 7, 346; 2. BÜCHER T., MATZELT D., PETTE D.: Klin. Wschr. (1952) 30, 13-14, 228; 3. CLAUSEN J.: Danish Med. Bull. (1962), 9, 1, 1; 4. ESSER H., HEINZLER F., WILD F.: Klin. Wschr. (1952), 30, 11/12, 228; 5. GELLER D. S., SMIRNOV J. K.: Lab. Delo (1958), 5, 4, 31; 6. GRIES G., ALY F. W., OLDERHAUSEN F. W.: Klin. Wschr. (1953), 31, 27/28, 644; 7. KERÉKES M., KOVACS E.: in vol. „Electroforeza pe hirtie în medicină și biologie”, Edit. Acad. R.P.R. (1963), 59; 8. KING jr. J. S., FIELDEN M. L., BOYLE W. H.: Proc. Soc. exp. Biol. Med. (1961), 108, 726; 9. KOHN J.: Nature (1959), 183, 1055; 10. KUTZIM H.: Dtsch. Med. Wschr. (1954), 79, 5, 168; 11. LINDNER E. B., ELMQUIST A., PORATH H. J.: Nature (1959), 184, suppl. 20, 1965; 12. MAIER K. H., VOGGEL K.: Klin. Wschr. (1963), 41, 6, 286; 13. MIES H. J.: Klin. Wschr. (1953), 31, 7/8, 159; 14. MÓDY E.: Rev. Med. (1954), 10, 4, 441; 15. PIEPER J.: Klin. Wschr. (1954), 32, 25/26, 597; 16. PIEPER J., SCHMIDT H.: Zschr. ges. exp. Med. (1956), 127, 418; 17. PORATH J.: Biochim. Biophys. Acta (1960), 39, 193; 18. REID C. E., SPENCER H. G.: J. Appl. Polymer. Sci. (1960), 4, 12, 354; 19. SIEGELMANN H. W., FIRER E. M.: Analyt. Biochem. (1962), 3, 435; 20. SCHRÖER H., IMHOF E.: Klin. Wschr. (1957), 35, 17, 890; 21. WALDMANN-MEYER H., LOBONELL C.: J. Lab. Clin. Med. (1954), 44, 2, 314; 22. WIKOFF H. L., KAZDAN P.: Am. J. Clin. Path. (1951), 21, 12, 1173;