

DISTRIBUȚIA AGLUTININELOR ÎN FRAȚIUNILE CROMATOGRAFICE ALE IMUNOGLOBULINELOR

A. Cojocar, A. Olteanu, I. Șovrea, C. Mărgineanu

Cercetările din ultimul deceniu, efectuate cu tehnica ultracentrifugării (26, 42), a imunoelectrofrezii (18, 4, 12, 41) și a cromatografiei proteinelor serice pe coloană cu schimbători de ioni celulozici (14, 35, 44, 5) și geluri filtrante (21, 11, 31, 31) au stabilit în mod cert eterogenitatea globulinelor gama. Componentii principali ai sistemului globulinic, γ 1A-, γ 1M- și γ 2- globulinele, cunoscute și sub numele de imunoglobuline (22, 39, 40, 43, 29, 17), prezintă un interes teoretic și practic deosebit, dat fiind structura globulinică a anticorpilor.

Dacă asupra repartizării anticorpilor sensibilizanți cutanați și precipitanți în fracțiunile cromatografice ale gama-globulinelor există unele date în literatură (3, 6, 7, 23, 24, 26), studiul cromatografic al aglutininelor s-a adresat până în prezent mai ales serului integral, limitându-se astfel posibilitatea de individualizare a fracțiunilor imunologic active. Acest fapt ne-a determinat să studiem distribuția aglutininelor în fracțiunile cromatografice ale gama-globulinelor, obținute prin precipitare cu solvenți organici, în scopul identificării fracțiunilor cromatografice cu titru înalt de anticorpi și purificării ulterioare a acestora.

Material și metodă

Experiențele s-au făcut pe iepuri imunizați cu o suspensie de *S typhimurium*, împărțiți în loturi de 15—30 animale. Din serurile împreună colectate ale animalelor din același lot au fost preparate globulinele gama după Dubert și colab. (13), puritatea materialului proteic obținut fiind controlată prin electroforeză pe hirtie după Grassmann și colab. (20).

DEAE-celuloza a fost preparată de către Șt. Secăreanu și colab. prin condensarea dietil-amino-etanolului cu clorură de tionil în benzen anhidru, conținutul în azot al anionitului fiind de 1,20%, aproape același ca și în cazul utilizării de către Peterson și Sober a celulozei Solka-Floc (32, 36, 37).

Cercetările s-au efectuat în laboratoarele Catedrei de fiziologie a I.M.F. Cluj, utilizând un colector automat de fracțiuni cu comandă electronică, cu volume de efluent reglabile, construit de V. Șoltuz. Adsorbția proteinelor pe anionitul echilibrat cu tamponul de fixare, ca și eluția fracțiunilor cromatografice, s-a făcut în laboratorul frigifer al filialei din Cluj a Academiei R.S.R.; temperatura s-a menținut constantă la $3 \pm 1^\circ$ C printr-un dispozitiv de autoreglare construit de D. Poruțiu, prevenindu-se astfel alterarea proteinelor. Pentru controlul pH-ului soluțiilor tampon s-a utilizat triodometrul RF tip 4 G.

Determinarea proteinelor totale din eluat s-a făcut cu metoda Lowry, cu reactivul Folin-Ciocalteu (28). S-a utilizat un fotocolorimetru tip ФЭК-М, fotometrarea probelor făcându-se imediat după desorbție. S-a stabilit o curbă de etalonare cu gama-globuline, determinându-se conținutul în azot cu micrometoda Kjeldahl (25).

Titrarea aglutininelor din fracțiunile cromatografice ale gama-globulinelor s-a făcut cu tehnica Widal; în unele cazuri determinarea aglutininelor s-a executat atât cu antigenul somatic, cât și cu cel flagelar (30).

După hidroliza tripsică cu metoda descrisă de Gurvici și colab. (19) și de Chernoff și Liu (9) a proteinelor din fracțiunile cromatografice ale gama-globuli-

nelor specifice, s-au analizat peptidele rezultate cu tehnica electroforezei la înaltă tensiune după Clotten și Clotten (10).

Rezultate și discuții

Prin cromatografierea „step wise” a gama-globulinelor specifice (aglutinine anti-typhimurium) se obțin 5 fracțiuni cromatografice eluate după următoarea schemă: I. fosfați de sodiu 0,01 M, pH 8,0; II. fosfați de sodiu 0,05 M, pH 7,5; III. fosfați de sodiu 0,10 M, pH 7,0; IV. acetat 0,20 M, pH 5,0; V. acetat 0,20 M, pH 3,6.

Aglutininele se distribuie inegal în fracțiunile cromatografiate, concentrându-se în fracțiunea a V-a eluată cu tamponul de acetat 0,20 M, pH 3,6 cu titrul 1/1024 față de antigenul H și 1/512 față de antigenul O. în comparație cu gama-globulinele totale cu titrul de 1/128, respectiv 1/64 și cu rezultatul fracțiunilor cromatografice în care titrul era de 1/4—1/32.

Analiza electroforetică a peptidelor, rezultate din digestia tripsică a gama-globulinelor specifice, demonstrează repartizarea diferită ca număr și concentrație a acestora în fracțiunile cromatografice, ceea ce pledează pentru eterogenitatea lor.

Studiind repartizarea izohemaglutininelor anti-A și anti-B în fracțiunile cromatografice ale serului uman, Fahey și Morrison (15) obțin, ca și în cazul nostru 5 fracțiuni cromatografice distincte. În fracțiunea I, aglutininele se găsesc în cantitate redusă, avind constanta de sedimentare 6,6 S, pe când în fracțiunea V, care conține majoritatea aglutininelor anti-A și anti-B, gama-globulinele au constanta de sedimentare 18 S (macroglobuline). Abelson și Rawson (1) găsesc că izohemaglutininele sînt prezente în trei fracțiuni cromatografice, dintre care una conține gama-globulinele cu constanta de sedimentare 6,6 S. Studiind prin cromatografiere pe DEAE-celuloză aglutininele din serul iepurilor imunizați cu *S. typhi*, Pike și Schulze (33) constată prezența aglutininelor în fracțiunile D și B, fracțiunile A și C conținând cantități reduse. Autorii citați aduc dovezi despre existența anticorpilor 7 S față de antigenul somatic al *S. typhi*. Prin tratare cu mercaptoetanol titrul fracțiunii A, conținând aproape în întregime 7 S gama-globuline, rămîne neschimbat, aglutininele din fracțiunea D fiind complet inactivate.

În concordanță cu lucrările autorilor citați, cercetările noastre atestă distribuția inegală a aglutininelor în fracțiunile cromatografice ale gama-globulinelor specifice, relevînd totodată comportarea cromatografică diferită a aglutininelor anti typhimurium față de alte tipuri de anticorpi [izohemaglutinine (38), reagine (2, 23), precipitine (16)]. Acest fapt, care poate fi pus în corelație cu proprietățile fizico-chimice ale proteinelor studiate, procedează de fixare pe adsorbant și dezvoltare a cromatogramei, are implicații practice în elaborarea unei scheme generale de cromatografiere și purificare a gama-globulinelor specifice.

Concluzii

1. Prin cromatografierea pe coloană cu DEAE-celuloză a gama-globulinelor din serul de iepure imunizat cu *S. typhimurium*, se obțin 5 fracțiuni cromatografice distincte.

2. Fracțiunile obținute sînt reproductibile în toate cromatogramele.

3. Determinarea titrului aglutininelor atestă distribuția inegală a anticorpilor în fracțiunile cromatografice studiate.

4. S-a individualizat o fracțiune cromatografică cu titrul aglutinant maxim, prin eluție cu tampon de acetat 0,20 M la pH 3,6.

Sosit la redacție: 23 mai 1966.

1. ABELSON W. M., RAWSON A. J.: *Immunol.* (1959), 82, 435; 2. BACIU I., COJOCARU A., ȘOVREA I., OLTEANU A., MUREȘAN V.: *Fiziol. norm. pat.* (1965), 11, 439; 3. BACIU I., COJOCARU A., ȘOLTUZ V., MOCODEAN I., MUREȘAN V.: *Stud. cercet. med. Cluj* (1961), 12, 177; 4. BARRETT B., WOOD P. A., VOLWILER W.: *J. Lab. Clin. Med.* (1960), 55, 605; 5. BENETATO GR., BACIU I., SECĂREANU ȘT., COJOCARU A., MOCODEAN I., VITEBSKI V., SOLTUZ V.: *Rev. des Sciences Méd.* (1962), 7, 7; 6. BOOKMAN R., SHEN J.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* (1961), 107, 542; 7. BRATTSSEN J., COLLD AHL H., LAURELL A.H.F.: *Acta Allerg.* (1955), 8, 1; 8. CALMON C., KRESSMAN T.R.E.: *Ion exchangers in organic and biochemistry.* Interscience Publishers Inc. New York, 1957; 9. CHERNOFF A. I., LIU J. C.: *Blood* (1961), 17, 54; 10. CLOTTEN R., CLOTTEN A.: *Hochspannungs-Elektrophorese. Ihre Anwendungsmöglichkeiten für Biochemische und Klinisch-Chemische Trennprobleme,* Georg Thieme Verlag, Stuttgart, (1962); 11. CORNILLOT P., BOURRILLON R., MICHOU J., GOT R.: *Biochim. Biophys. Acta* (1963), 71, 89; 12. CROWLE A. J.: *J. Lab. Clin. Med.* (1962), 59, 697; 13. DUBERT J. M., SLIZEWICZ P., REBEYROTTE P., MACHEBOEUF M.: *Ann. Inst. Pasteur* (1953), 84, 370; 14. FAHEY J. L., HORBETT A. P.: *J. Biol. Chem.* (1959), 234, 2645; 15. FAHEY J. L., MORRISON E. G.: *J. Lab. Med.* (1960), 55, 912; 16. GLENCHUR H., SEAL U. S., HALL W. H., ZINNEMAN H. H.: *Lab. Clin. Med.* (1960), 56, 818; 17. GLANCHUR H., SEAL U. S., ZINNEMAN H. H., HALL W. W.: *J. Lab. Clin. Med.* (1962), 59, 220; 18. GRABER P.: *Immun-electrophoretic Analysis, in „Methods of Biochemical Analysis”,* edited by D. Glick, Interscience Publishers inc. New York, Interscience Publishers Ltd. London (1959), 1, 7; 19. GURVICI A. E., GUBERNIEVA L. M., MIASOEDOVA K. N.: *Biochimija* (1961), 26, 468; 20. GRASSMANN W., HANNIG G., KNEDEL M.: *Dtsche Med. Wschr.* (1951), 11, 333; 21. HANSON L. A., JOHNSON B. G.: *Nature* (1963), 187, 599; 22. HEREMANS J. F., CARBONARA A. O.: *Acta Clin. Belgica* (1962), 17, 502; 23. HUMPHREY J. H., PORTER R. R.: *Lancet* (1957), 272, 6961, 196; 24. ISHIZAKA K., ISHIZAKA T., HORNBOK M. M.: *J. Allergy* (1963), 34, 395, 25. KABAT E. A., MAYER M. M.: *Experimental Immunochimistry* Ed. II. C. Thomas Publishers Springfield, Illinois, U.S.A. (1961); 26. KAPUSTA M. A., HALBERSTAM D.: *Biochim. Biophys. Acta* (1964), 93, 657; 27. KUHNS W. J.: *J. Exp. Med.* (1954), 99, 577; 28. LOWRY O. H., ROSENBOUGH N. J., FARR A. J., RANDALL R. J.: *J. Biol. Chem.* (1961), 195, 265; 29. MOGOS G.: *Proteinele, Ed. Med. București* (1964); 30. NES-ȚORESCU N.: *Bacteriologie medicală, Ed. Med. București* (1961); 31. PAIN R. H.: *Biochim. Biophys. Acta* (1965), 94, 183; 32. PETERSON E. A., SOBER H. A.: *J. Amer. Chem. Soc.* (1956), 78, 751; 33. PIKE R. M., SCHULZE M. L.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* (1964), 115, 829; 34. SELA M., GIVOL D., MÖZES E.: *Biochim. Biophys. Acta* (1963), 78, 649; 35. SOBER H. A., GUTTER F. J., WYCKOFF M. M., PETERSON E. A.: *J. Amer. Chem. Soc.* (1956), 76, 756; 36. SOBER H. A., KEGELES G., GUTTER F. J.: *Science* (1949), 110, 564 citat de (8); 37. SOBER H. A., KEGELES G., GUTTER F. J.: *J. Amer. Chem. Soc.* (1952), 74, 2734 (citat de 8); 38. SPEER R. J., PRAGER M. D., KELLEY T. F., HILL J. M.: *J. Lab. Clin. Med.* (1959), 54, 685; 39. STOICA G., GROZEA P.: *Abstracts Xth Congress of the International Society of Haematology D₄₀*, (1964); 40. STOICA G., GINGOLD N., MOLDOVANU A.: *Abstracts Xth Congress of the International Society of Haematology D₃₉* (1964); 41. URIEL J., GRABAR P.: *Ann. Inst. Pasteur* (1956), 90, 427; 42. WILLKENS R. F., DRESCHLER M., LARSON D. L.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* (1958), 90, 645; 43. YAGI Y., MAYER P., PRESSMAN D., ARBETSMAN C. E., REISMAN R. E., LENZNER A. R.: *J. Immunol.* (1963), 90, 760; 44. YIP C. C.: *Biochim. Biophys. Acta* (1965), 96, 75.