

## CONTRIBUȚII EXPERIMENTALE LA STUDIUL CROMATOGRAFIC AL ANTICORPILOR

A. Cojocarú

Rolul important pe care îl detin în reacția specifică de apărare globulinele gama ne-a determinat să încercăm fracționarea lor cromatografică pe CM- și DEAE-celuloză și să studiem unele din proprietățile fizico-chimice și funcționale ale fracțiunilor cromatografice obținute, datele din literatură în această privință fiind sporadice sau contradictorii (*Willkens* și colab., 19, *Fahey* și *Horbett* 8). În această direcție am întreprins în colaborare, în laboratoarele catedrei de fiziologie din Cluj, începând din 1959, din inițiativa și sub conducerea prof. dr. docent I. Baciú, o cercetare sistematică, aplicând pentru prima dată la noi în țară procedeul de cromatografiere a proteinelor serice pe coloană, inițial cu schimbători de ioni celulozici iar ulterior cu geluri filtrante (I. Baciú și colab. 1, 2, Gr. *Benetato* și colab. 3).

### Material și metodă

Prepararea CMC s-a făcut prin carboxilarea celulozei Whatman, iar a DEAE C din celuloza Whatman prin acțiunea 2-cloretil-dietil-aminei. Pentru colectarea fracțiunilor s-a utilizat un colector cu comandă electronică cu volume de efluent reglabile. Într-o primă etapă a cercetărilor noastre au fost cromatografiate pe CMC gama-globulinele obținute din serul de iepure normal, prin precipitare la rece cu metanol după *Dubert* și colab. (7). Determinarea proteinelor din eluat s-a făcut după metoda lui *Lowry* și colab. (12). Pentru individualizarea fracțiunilor cromatografice s-a făcut hidroliza tripsică a proteinelor, iar peptidele obținute au fost fracționate cu tehnica electroforezei la înaltă tensiune (*Clotten* și *Clotten*, 6).

Pentru studiul distribuției reaginilor și precipitinelor în fracțiunile cromatografice ale gama-globulinelor specifice, s-au preparat animalele prin imunizare cu ovalbumină cristalizată, respectiv cu bacili typhi murium. Experiențele s-au făcut pe iepuri împărțiți în loturi de 5—30 animale. Studiul imunologic al fracțiunilor cromatografice obținute s-a efectuat cu tehnicile descrise de *Ouchterlony* (identificarea precipitinelor, 13), *Grabar* (imunoelectroforeză în gel de agar, 9), *Ovary* și *Biozzi* (testarea reaginilor prin tehnica anafilaxiei pasive cutanate a cobaiului, 14) și *Widal* (determinarea titrului aglutininelor, 10).

### Rezultate și discuții

Prin cromatografierea gama-globulinelor pe coloană de CMC cu tampon de fosfați 0,05 M, pH 5,0 și concentrații crescînde de sodiu se obțin 2 fracțiuni cromatografice distincte. După multiple încercări, utilizînd pentru eluție numai gradientul de pH al tamponului de fosfați, am reușit să fracționăm gama-globulinele în 7 fracțiuni cromatografice principale (1). Pe DEAE C gama-globulinele au fost fracționate cu tampon de fosfați și acetat, cu variații de pH și concentrație molară a tamponului, obținîndu-se 5 fracțiuni cromatografice distincte. Reproducem în fig. 1, din lucrările noastre anterioare, aspectul unei cromatograme standard. Fracțiunile gama izolate au mobilitatea electroforetică diferită iar analiza electroforetică la înaltă tensiune a peptidelor rezultate prin digestia tripsică demonstrează repartizarea diferită ca număr și concentrație a acestora în fracțiunile cromatografice. În ceea ce privește distribuția anticorpilor în fracțiunile cromatografice obținute, din datele noastre reiese că anticorpii precipitanți și sensibilizanți cutanați se concentrează în fracțiunile cromatografice eluate de pe

DEAEC cu tamponul de fosfați 0,05 M. la pH 7.50 (2). Aglutininele, la fel, se distribuie inegal în fracțiunile cromatografiate pe DEAEC, ele concentrându-se în fracțiunea 5 eluată cu tamponul de acetat 0.20 M la pH 3.6 (5).

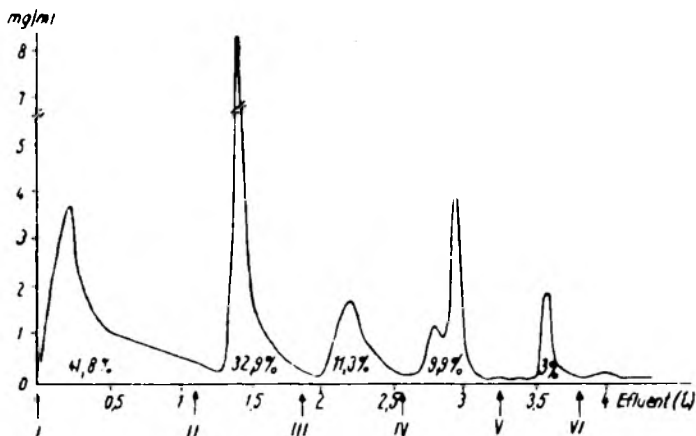


Figura 1: Cromatograma 4. Schimbătorul de ioni: DEAE-celuloză. Dimensiunile coloanei: 50 cm/3.5 cm. Material de studiu:  $\gamma$ -globuline specifice. Echilibrarea coloanei: tampon borat / acid clorhidric 0.01 M. pH 8.54. Eluție fără gradient. Soluții tampon pentru eluție: I. Tampon de fosfați 0.01 M. pH 7.75; II. Tampon de fosfați 0.05 M. pH 7.50; III. Tampon de fosfați 0.10 M. pH 6.00; IV. Tampon de acid acetic-acetat 0.20 M. pH 5.0; V. Tampon de acid acetic-acetat 0.20 M. pH 3.5; VI. NaCl 0.50 M. Debit: 5 ml/oră.

Cromatografierea proteinelor serice pe coloană a schimbătorilor de ioni și geluri filtrante a deschis promițătoare perspective în direcția obținerii subfracțiunilor globulinice pe cale preparativă și în general a constituenților biologic activi ai plasmelor sanguine. Dacă utilizarea rășinilor polistirenice a găsit o aplicabilitate restrânsă în cromatografia proteinelor serice, datorită porozității reduse a ionizilor rezinici față de dimensiunile macromoleculelor proteice, în schimb procedeul de cromatografiere a proteinelor plasmatice pe ionizii celulozici și geluri filtrante cunoaște o largă aplicabilitate.

Inițial izolarea componentilor proteici plasmatici s-a făcut din plasma integrală utilizând derivații acizi și bazei de celuloză, preparați după tehnica descrisă de Peterson și Sober (15). În 1956 Sober și colab. (17) fracționează cei dintii proteinele serice pe DEAEC obținând un mare număr de constituenți, notați de autori pentru serul uman de la a-p iar pentru serul de cal de la A-J, cea mai mare parte dintre aceștia fiind intricăți pe diagrama de eluție fără posibilitatea unei diferențieri nete prin „linia de zero” a densității optice. Frațiunile cromatografice nu sînt electroforetic omogene: primii componenți cromatografici au viteza de deplasare a gama-globulinelor, ultimii mobilitatea albuminelor, eluția proteinelor făcîndu-se în ordinea crescîndă a mobilității lor electroforetice. Speer și colab., tinzînd să găsească o schemă de fracționare de largă reproductibilitate a proteinelor serice pe DEAEC, studiază efectul diferitelor sisteme de eluție asupra separării proteinelor din serul integral, evaluînd cromatogramele prin măsurători spectrofotometrice ale densității optice la 280  $m\mu$ , determinarea mobilității electroforetice, a distribuției proteinelor marcate radioactiv și anticorpilor grupelor sanguine

(18). Autorii găsesc că anticorpii anti-A și anti-B sînt prezenți în aceeași regiune a cromatogramei, pe cînd anticorpii anti-Rh au o distribuție largă în fracțiunile cromatografiate, indicînd o mare eterogenitate. Incercările de fracționare a serului integral limitînd posibilitățile de diferențiere (fracțiunile cromatografice pot conține 1—3 fracțiuni electroforetice) *Willkens* și colab. (19) renunță în 1958 la acest procedeu, izolînd în prealabil prin convecție electroforetică cu tampon de fosfați 0.5 M, pH 7.4 gama-globulinele din serul normal și din serul bolnavilor de lupus eritematos. Autorii citați obțin două fracțiuni cromatografice notate cu A și B și identifică 7 componenți antigenici, cei mai mulți în fracțiunea A (3—5 componenți).

Procedeele de cromatografiere pe CMC utilizat de noi, permițînd obținerea a 7 fracțiuni cromatografice, se deosebește de procedeele lui *Willkens* și colab. prin faptul că eluarea fracțiunilor se face exclusiv prin modificarea pH-ului, fără utilizarea concomitentă a gradientului de salinitate (NaCl). Activitatea ionului de sodiu față de grupările carboxilice ale cationitului celulozic, este mult superioară afinității oricărui ion proteic, ceea ce exclude capacitatea lui de eluție diferențiată.

Cromatografierea în experiențele noastre a gama-globulinelor pe DEAE C cu utilizarea procedeele uzuale de eluție (eluția „step-wise” cît și eluția cu gradient de pH și molaritate) confirmă observațiile lui *Fahey* și *Horbett* (8), referitoare la caracterul continuu a eluției gama-globulinelor cu tamponul de fosfați, precizînd totodată faptul că, prin introducerea ulterioară a tamponului de acetat, capacitatea de diferențiere crește, obținîndu-se o nouă deflexiune cromatografică. Corelînd datele noastre electroforetice cu rezultatele obținute de *Fahey* și *Horbett* prin ultracentrifugarea fracțiunilor, se poate estima prezența 7 S — gama-globulinelor în prima deflexiune, iar a macroglobulinelor 18 S în fracțiunile corespunzătoare sfîrșitului primei deflexiuni și în a doua deflexiune cromatografică.

La testarea reaginei și precipitinelor din fracțiunile cromatografice ale gamaglobulinelor s-a constatat în experiențele noastre concentrarea anticorpilor sensibilizanți cutanați și a precipitinelor în primele 2 fracțiuni cromatografice eluate cu tamponul de fosfați 0,01 M, pH 7,75 respectiv 0,05 M, pH 7,50. Astfel, reacția de anafilaxie pasivă cutanată a cobaiului este pozitivă pentru fracțiunea 1 la cantități de proteine egale cu cele utilizate pentru reacția prag (9  $\mu$ g gamaglobuline) pe cînd pentru fracțiunea 5 chiar la o cantitate de 197 ori mai mare decît valoarea prag, reacția de anafilaxie pasivă cutanată rămîne încă negativă.

Prin recromatografierea cu gradient de pH și molaritate a fracțiunilor 1 și 2 reunite, cu tamponul de fosfați, 0,05 M, pH 7,50 ce eluează fracțiunea 2, se obține în cercetările noastre o singură fracțiune cromatografică: gama-globulinele din zona centrală a acesteia dau o singură linie de precipitare în gel de agar în prezența antigenului. Este evidentă, pe baza rezultatelor noastre, concentrarea anticorpilor sensibilizanți cutanați și precipitinelor în primele 2 fracțiuni cromatografice și purificarea avansată a acestora față de procedeele de precipitare (4). Un grad propunat de puritate a fost obținut și în cazul aglutininelor anti-tyhi murium (5). În cercetări încă nepublicate, efectuate în colaborare cu M. *László* și O. *Pállfy*, distribuția inegală a anticorpilor în subfracțiunile cromatografice ale gama-globulinelor specifice se constată și pentru hemolizine ceea ce permite la fel obținerea lor într-un stadiu avansat de puritate.

Asupra structurii anticorpilor izolați cromatografic există numeroase controverse. Cercetările recente sugerează că anticorpii sensibilizanți cutanați la om pot fi  $\gamma$ A-globuline a căror constantă de sedimentare este 7 S cu tendința de a forma polimeri, rezultînd complexe de ordinul a 9—13 S. Și în ceea ce privește structura precipitinelor și a aglutininelor datele existente în literatură sînt extrem de lacunare. Astfel *Pike* și *Schulze* studiînd aglutini-

nele din serul integral al iepurilor imunizați cu *S. typhi*, constată prezența în fracțiunea A eluată cu tamponul de fosfat 0,01 M, pH 8,0 aproape în întregime a 7 S-gama-globulinelor iar în fracțiunea B eluată cu tamponul de fosfați 0,03 M, pH 4,5 a macroglobulinelor 18—20 S (16). Cantitățile reduse de aglutinine obținute prin cromatografierea serului integral n-au permis în cercetările autorilor menționați investigații mai amănunțite asupra structurii anticorpilor studiați.

Fracționarea cromatografică în cercetările noastre a gama-globulinelor specifice, precipitate în prealabil din serul integral cu solvenți organici și recromatografierea subfracțiunilor diferențiate, permițând obținerea anticorpilor într-un stadiu avansat de puritate și în cantități suficiente pentru studiu, crează premise pentru aprofundarea corelației dintre structura și funcția proteinelor-anticorpi și extinderea cimpului nostru de investigații în domeniul studiului anticorpilor și al factorilor umorali nespecifici ai imunității.

### Concluzii

În cercetări experimentale asupra fracțiunilor cromatografice ale globulinelor serice s-a stabilit că cromatografierea globulinelor serice pe coloană cu DEAC permite separarea fracțiunii gama de restul fracțiunilor globulinice, obținându-se 5 fracțiuni cromatografice distincte.

Prin cromatografierea gamaglobulinelor pe CMC cu gradient de pH, se obțin 7 fracțiuni cromatografice principale.

Izolarea din gama-globuline a 5—7 fracțiuni cromatografice cu conținut variat în lipide, glucide și peptide și mobilitate electroforetică diferită, constituie o dovadă în plus a eterogenității proteinelor sistemului gama.

Distribuția anticorpilor este inegală în fracțiunile cromatografice ale gama-globulinelor, ceea ce permite obținerea lor într-un stadiu mai avansat de purificare față de procedeele de precipitare. Anticorpii precipitanți și sensibilizanți cutanați se concentrează în fracțiunile cromatografice eluate de pe DEAC cu tamponul de fosfați 0,05 M, pH 7,50, iar aglutininele în fracțiunea eluată cu tamponul de acetat 0,20 M, pH 3,6.

Interesul practic al cercetărilor noastre rezidă în obținerea pe cale preparativă a constituenților biologic activi ai plasmei, cu rol în reacția de apărare, într-un stadiu mai avansat de purificare față de procedeele de precipitare și în cantități suficiente pentru studiu.

*Sosit la redacție: 4 octombrie 1967.*

### Bibliografie

1. BACIU I., COJOCARU A., SOLTUZ V., MOCODEAN J., MUREȘAN V.: Stud. cercet. med. Cluj (1961), 12, 177; 2. BACIU I., COJOCARU A., SOVREA I., OLTEANU A., MUREȘAN V.: Fiziol. Norm. și pat. (1965), 11, 439; 3. BENETATO GR., BACIU I., SECĂREANU ȘT., COJOCARU A., MOCODEAN J., VITEBSKI V., SOLTUZ V.: *Révue des Sciences médicales* (1962), 7, 7; 4. COJOCARU A.: Cercet. experimentale asupra fracțiunilor cromatografice ale globulinelor serice, în cursul reacției de adaptare la stimuli nespecifici și antigenici, Teză. Cluj 1965; 5. COJOCARU A., OLTEANU A., SOVREA I., MĂRGINEANU C.: *Rev. Medicală* (1966), 12, 281; 6. CLOTTEN R., CLOTTEN A.: *Hochspannungs-Elektrophorese*, Georg Thieme Verlag Stuttgart 1962; 7. DUBERT J. M., SLIZEWICZ P., REBEYROTTE P., MACHEBOEUF M.: *Ann. Inst. Pasteur* (1953), 84, 370; 8. FAHEY J. L., HORBETT A. P.: *J. Biol. Chem.* (1959), 234, 2645; 9. GRABAR P.: *Immunoelectrophoretic Analysis in „Methods of Biochemical Analysis“* Edited by D. Glick, Interscience Publisher Inc. New York 1959, VII, 1; 10. GOLD E. R.: *Imunologie practică*, Ed. Med. București 1957; 11. HUMPHREY J. H., PORTER R. R.: *Lancet* (1957), 272, 6961, 196; 12. LOWRY O. H., ROSENBOUGH N. J., FARR A. J., RANDALL R. J.: *J. Biol. Chem.* (1961), 195, 265; 13. OUCHTERLONY O.: *Acta Path. et Microbiol. scand.* (1949), 26, 507; 14. OVARY Z.,

BIOZZI G.: Intern. Arch. Allergy (1954), 5, 241; 5. PETERSON E. A., SOBER H. A.: J. Am. Chem. Soc. (1956), 78, 751; 16. PIKE R. M., SCHULZE M. L.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. (1964), 115, 829; 17. SOBER H. A., GUTTER F. J., WYCKOFF M. M., PETERSON E. A.: J. Am. Chem. Soc. (1956), 78, 756; 18. SPEER R. J., PRAGER M. D., KELLEY T. F., HILL J. M.: J. Lab. Clin. Med. (1959), 54, 685; 19. WILLKENS R. F., DRESCHLER M., LARSON D. L.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. (1958), 90, 645.

---