

Baza de cercetări științifice din Tirgu Mureș a Academiei Republicii Socialiste România (director: prof. M. Gündisch, doctor-docent), Catedra de biochimie a I.M.F. Tirgu Mureș (cond.: prof. A. Kovács, doctor în chimie)

STUDIUL PROTEINELOR ALCOOLO SOLUBLE DIN MĂDUVA SPINĂRII DE BOU*

M. Kerekes, dr. J. Kelemen, A. László

O metodă mai puțin utilizată de preparare a proteinelor tisulare este tratarea acestora cu acid tricloracetic (ATA) (8), urmată apoi de extracția precipitatului cu solvenți organici. Extractele alcoolice sau alcoole-eterice acide de creier, astfel preparate, conțin proteine care au fost considerate ca aparținând grupei proteolipidelor. Recent, s-a demonstrat că și alte categorii de proteine ca albumina serică, globina și gelatina sînt solubile în etanol acidifiat cu ATA, acid clorhidric sau acid fosforic (2, 3).

* Lucrare prezentată la Sesiunea științifică anuală din 1969, a Institutului de neurologie al Academiei Republicii Socialiste România.

În urma tratării serului cu metanol acidifiat cu acid clorhidric, la temperatura camerei, este extrasă aproape întreaga cantitate de albumină, în timp ce globulinele precipită. Albumina recuperată din soluția alcoolică s-a dovedit a fi nealterată (3, 6).

Otsuki și Geiger (5), prin metoda extracției cu etanol acidifiat cu ATA, au reușit să extragă aproximativ 18 % a proteinelor din creierul de piscă și șoarece.

Experiențele prezentate în această lucrare au avut ca scop prepararea unui extract acid alcoolic din măduva spinării de bou și studierea unor proprietăți ale proteinelor extrase, în special comportarea electroforetică și activitatea encefalitogenă ale acestora.

Material și metodă

Măduva spinării de bou s-a obținut de la abatorul local, la câteva ore după sacrificarea animalelor. După îndepărtarea leptomeningelor și spălarea cu ser fiziologic, măduva tăiată în bucățele s-a omogenizat în 10 volume de metanol 90 %, cu un conținut de acid clorhidric în concentrația de 0,02 N, într-un omogenizator Ultra-Turrax, la temperatura camerei, timp de 3 minute. A urmat agitarea lentă a amestecului timp de 30 de minute, tot la temperatura camerei. Emulsia astfel obținută s-a centrifugat la turație mică (2000 rot./min.), spălând reziduul de două ori cu metanol acidifiat. S-a îndepărtat reziduul, iar supernatantul a fost amestecat cu lichidele de spălare.

Am tratat soluția metanolică clară cu o soluție de NaOH 0,1 N în metanol, pînă la obținerea pH-ului 6. S-a format un precipitat alb pufos, care s-a depus pe fundul vasului. După decantarea lichidului clar am centrifugat precipitatul, spălându-l de două ori cu eter și uscându-l la aer, apoi în exsicator de vid. Preparatul obținut se prezintă sub formă de bucățele albe, cu o nuanță brună la suprafață.

Conținutul total de proteine din măduva spinării s-a determinat după metoda lui Nayyar și Glick (4), precipitarea cu bromsulfaleină fiind însă înlocuită cu reacția biuret, efectuată cu reactivul Weichselbaum (9). Ca etalon s-a folosit albumina serică bovină cristalizată.

Electroforeza s-a făcut pe coloană de gel de acrilamidă, cantitatea de proteine fiind aceeași la toate probele.

Activitatea encefalitogenă a preparatului a fost observată pe 10 cobai de ambele sexe, cu o greutate medie de 300 g. Administrarea antigenului a fost precedată de injectarea a 0,5 ml vaccin antipterisus pe cale subcutanată. La trei zile după această injecție s-a administrat fiecărui cobai 0,5 ml antigen preparat cu proteina extrasă, intracutan, în piciorul posterior stîng. Injectarea s-a repetat după 7 zile.

Rezultate

A. *Randamentul extracției.* În măduva spinării de bou am găsit un conținut total de proteine de 105 mg/g țesut proaspăt, ceea ce corespunde cu datele din literatura de specialitate (7). Din 100 g de măduvă proaspătă s-a obținut 1,85 g de proteină. Luînd în considerare și unele pierderi, cantitatea de proteină extrasă constituie aproximativ 20 % din cantitatea totală de proteină prezentă în măduvă.

B. *Unele proprietăți ale fracțiunii proteice alcoolosolubile.* Aproximativ 54 % din proteina extrasă poate fi redizolvată în tampon fosfat (0,01 M, pH 7,5). Dializînd extractul alcoolic față de apă, proteina a precipitat, devenind practic insolubilă în tampon.

Reacția cu antronă a proteinei hidrolizate cu HCl concentrat a fost pozitivă, indicînd prezența glucidelor. De asemenea, a fost pusă în evidență și prezența fosforului.

C. *Electroforeza proteinelor alcoolosolubile*. S-a aplicat pe coloană de gel de acrilamidă partea solubilă a proteinelor extrase, comparind proteinogramele obținute cu cele ale unui extract de măduvă, preparat cu tampon fosfat la pH 7,5 și cu ser uman normal (fig. nr. 1).

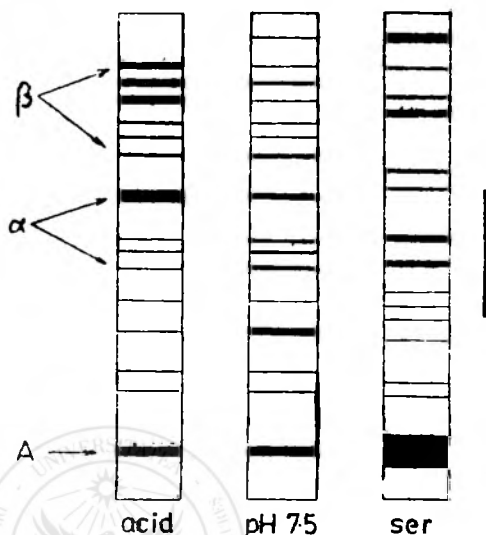


Fig. nr. 1. Analiza electroforetică a proteinelor alcoolosolubile din măduva spinării de bou. Acid=extractul obținut cu metanol acidificat cu HCl; pH 7,5=extract preparat cu tampon fosfat; ser=ser uman normal; A=albumină; alfa=alfa-globuline; beta=beta-globuline.

Cantitatea de proteină aplicată a fost aceeași în toate cazurile. Proteograma ambelor extracte arată cca. 15 fracțiuni proteice. Repartiția cantitativă a acestora este însă net diferită. Frațiunile cu o mobilitate mai redusă sînt prezente într-o cantitate mult mai mare în preparatul obținut prin extracție alcoolică, decît în cel cu tampon.

D. *Activitatea encefalitogenă a extractului alcoolic*. La trei săptămîni după prima inoculare am observat la trei animale sacrificate apariția parezei membrului posterior. Examenul histopatologic al fragmentelor de creier a relevat semnele morfologice ale encefalitei alergice experimentale, reprezentate prin infiltrații limfo-histiocitare, situate mai ales în substanța albă subcorticală.

La restul animalelor, sacrificate la șapte săptămîni după prima inoculare, cu excepția unei pareze moderate, nu s-au observat semne neurologice accentuate, iar tabloul histopatologic nu a arătat semne evidente de inflamație, ci numai mobilizări gliale moderate pe alocuri, care ar putea fi considerate ca o reacție tardivă a unei forme ușoare de encefalită.

Discuții

Analiza electroforetică dovedește clar că, tratînd măduva spinării cu metanol acid, sînt extrase în primul rînd fracțiunile cu viteza de migrare mai lentă, care ar corespunde alfa- și beta-globulinelor și alfa- și beta-lipoproteinelor serice. Astfel, proteinele extrase sînt asemănătoare celor preparate de Otsuki și Geiger (5) din creier integral prin extracție cu etanol și ATA. Este foarte probabil că aceste fracțiuni aparțin grupei proteolipidelor. De asemenea, este semnificativ faptul că,

pe proteinogramă pot fi distinse practic toate fracțiunile proteice care sînt extrase și la un pH slab alcalin.

O concluzie la care se poate ajunge pe baza celor prezentate este că, proteinele tisulare în cazul de față cele din sistemul nervos, diferă mult de cele plasmatice. Prin același tratament, din măduvă sînt extrase globuline de tipul alfa- și beta, în timp ce din plasmă este extrasă exclusiv albumina. De altfel, Folch (1) a atras atenția asupra acestui fapt: „Proteinele cu proprietățile chimice cele mai cunoscute, ca cele din ou și plasmă, nu sînt în mod obligatoriu și cele mai tipice dintre toate proteinele; trebuie să terminăm cu obiceiul de a reflecta asupra proteinelor prin prisma ovoproteinelor și a celor plasmatice. Proteinele tisulare diferă complet de acestea”.

În ceea ce privește experiențele referitoare la activitatea encefalitogenă a proteinelor extrase, am constatat că extractul alcoolic posedă o acțiune encefalitogenă moderată. Prin urmare, agentul encefalitogen este parțial solubil în metanol acid. Fiind vorba de un amestec de proteine, desigur nu se poate decide cărei fracțiuni i se atribuie activitatea encefalitogenă. Un amănunt pozitiv îl constituie faptul că în timp ce la encefalomielita alergică experimentală provocată prin administrare de măduvă integrală, inflamația limfo-histiocitară se produce mai mult perivascular, la animalele tratate cu extract alcoolic pot fi observate focare infiltrative, de o extindere considerabilă, situate mai mult în substanța albă.

Bibliografie

1. FOLCH-PI P. J.: „Allergic encephalomyelitis“, Ed. M. W. Kies and E. C. Alvord Jr.), Thomas, Springfield, 1959, 308; 2. LEVINE S.: Arch. Biochem. Biophys. (1954), 50, 515; 3. MICHAEL S. E.: Biochem. J. (1962), 82, 212; 4. NAYYAR S. N., GLICK D.: J. Histochem. Cytochem. (1954), 2, 282; 5. OTSUKI S., GEIGER A.: J. Neurochem. (1963), 10, 415; 6. PETERS T. Jr.: J. Amer. Chem. Soc. (1958), 80, 2700; 7. ROSSITER R. J.: Neurichemistry (Ed. K. A. C. Elliot, I. H. Page, J. H. Quastel), Thomas, Springfield 1962, 10; 8. SCHNEIDER W. C.: J. Biol. Chem. (1945), 161, 293; 9. WEICHSELBAUM T. E.: Amer. J. Clin. Path. (1946), 16, 40.