

Clinica medicală nr. I din Tirgu Mureş (cond.: prof. dr. P. Dóczy, doctor-docent,
medic emerit, membru al Academiei de ştiinţe medicale)

STUDIUL COMPARATIV PE COLOANĂ DE DEAE-CELULOZĂ AL FRAȚIUNILOR DE FIBRINOGEN PROVENIND DE LA BOLNAVI SUFERIND DE POLIARTRITĂ CRONICĂ EVOLUTIVĂ

dr. Eva Kótay, dr. E. Módy, Clara Borsos, Maria Riza

Aplicarea metodelor de investigație ale patologiei moleculare în studierea anumitor procese de coagulare a creat posibilitatea stabilirii a numeroși factori etiologici în cazurile deficiențelor funcționale ale acestui sistem.

Modificarea structurală a proteinelor coaguloactive se traduce pe de o parte prin insuficiența funcțională biologică a acestora, proprietățile imunologice menținându-se intacte, iar pe de altă parte prin comportarea lor diferită față de proteinele normale din punct de vedere fizico-chimic. Diminuarea sau dispariția completă a calităților funcționale cu menținerea activității imunologice — evidențiable și la proteinele cu o concentrație redusă în sânge, ca în cazul factorilor anti-hemofilici VIII și IX, și al protrombinei — constituie un argument pentru o biosinteză defectuoasă a proteinei în cauză (2, 3, 16). Atenția asupra studiului molecular al proteinelor coaguloactive patologice a fost atrasă de cazurile de disfibrinogenemii congenitale (fibrinogenii Baltimore, Cleveland, Detroit, Paris I, Paris II etc.) (10, 12, 13).

Fibrinogenul se află într-o concentrație relativ mare în sânge, putând fi astfel izolat și studiat în stare pură și prin metode biochimice. Datorită acestui fapt,

În anumite cazuri de disfibrinogenemie congenitală s-a reușit punerea în evidență în mod direct a modificărilor structurale ale moleculei patologice. *Blombäck* și *Blombäck* (1) analizând fibrinogenul Detroit, au găsit că lanțul alfa (A) — peptidic arată o mobilitate anodică mai accentuată decât cea a fibrinogenului normal în cazul electroforezei în gel de poliacrilamid. Peptidele produse în urma digestiei triptice au fost supuse cromatografiei combinate cu electroforeză pe membrană de acetat de celuloză. Pe baza analizei de amprente digitale („fingerprint”) în lanțul peptidului nr. 7 în poziția a 19-a, arginina este înlocuită cu restul aminoacidic neutru al serinei. Peptidul nr. 9 normal, lipsește complet din produsul recoltat de la bolnav. Substituția argininei cu serină explică disfuncția proteinei, fie prin inhibarea eliberării fibrinopeptidelor, fie prin inhibarea fazei de polimerizare. Trombina desprinde de pe molecula fibrinogenului Detroit numai peptidul A, în mod asemănător ca și reptilaza, din care cauză devine posibilă numai o polimerizare longitudinală a monomerilor de fibrină.

Coagularea completă a fibrinogenului necesită o fracțiune glucidică intactă (*Mester*, 15). După *Mester* și *Szabados* (13) substituirea resturilor de aminoacizi poate influența legătura peptidică-glicidică în vecinătatea ei. Tulburarea biosintezei fracțiunii glucidice este pusă în evidență la fiecare caz de disfibrinogenemie congenitală și dobândită (de ex. cazurile de disfibrinogenemie la bolnavii hepatici, *Samama* 20, *Mester* 14) și se manifestă în primul rând prin creșterea cantității acidului sialic. Luând în considerare desfășurarea biosintezei fracțiunii glucidice, pare verosimil, ca tulburarea cea mai semnificativă să aibă loc în faza terminală, biosinteza acidului sialic.

În urma modificărilor structurale mai sus-amintite, spectrul cromatografic al fibrinogenului patologic poate să difere de la normal. *Mosesson* (citată de 11), analizând fibrinogenul Baltimore prin cromatografie pe coloană de DEAE-celuloză prin metoda eluției cu gradienti a constatat că, dintre cele două fracțiuni caracteristice ale fibrinogenului normal, cea dintâi apare cu întârziere în cazul cromatografiei fibrinogenului patologic, semnând o legătură anionică mai puternică. Primul vîrf cromatografic al fibrinogenului patologic este mai lat și mai simetric decât cel găsit la normal, pe ramura ascendentă a curbei apare și un „umăr” care pledează pentru eterogenitatea primei fracțiuni.

Pornind de la constatarea scăderii frecvente a fibrinolizei în antecedentele bolnavilor suferind de reumatism cronic, am reușit să punem în evidență prin metode biologice, respectiv cu ajutorul analizei cineticii enzimatice și prin studii polarografice semnele tulburării biosintezei fibrinogenului la acești bolnavi (5, 6, 7, 8, 9). Compoziția fibrinogenului bolnavilor diferă de la normal și prin conținutul lui crescut de glucide (21, 4). Pe baza acestor observații am presupus, că și în boala reumatismală cronică poate să fie vorba despre o „disfibrinogenemie”, o defecțiune caracteristică a fibrinogenului, care poate să se manifeste și prin modificarea curbelor de separare cromatografice.

În lucrarea de față prezentăm rezultatele studiului cromatografic al fibrinogenului recoltat de la 16 bolnavi suferind de artrită reumatoidă și de la 20 de martori.

Metodă de lucru

Singele recoltat cu oxalat de sodiu se centrifughează timp de 10 minute la o turație de 5000 T/min. Din plasma separată fibrinogenul se precipită prin saturarea cu Na_2SO_4 , precipitatul se spală de două ori cu soluție de Na_2SO_4 10,6%, după care se redizolvă în ser fiziologic într-un volum egal cu volumul plasmei. Soluția de fibrinogen se dializează față de tampon start timp de 18 ore.

Rășina de DEAE-celuloză (Serva, tip DEAE-SS, cu o capacitate de 0,67) este pregătită conform prescripțiilor (19), coloana de 1,5 cm diametru și 15 cm lungime se echilibrează timp de o noapte cu tampon start. Se introduce pe coloană 6 ml din soluția de fibrinogen dializat, se spală de două ori cu cite 6 ml tampon start. Eluția proteinelor se efectuează prin metoda diluțiilor treptate cu tamponi fosfați.

EVA KOTAY ȘI COLAB.: STUDIUL COMPARATIV PE COLOANA DE DEAE-
 CEIULOZA A FRAȚIUNILOR DE FIBRINOGEN PROVENIND DE LA BOLNAVI
 SUFERIND DE POLIARTRITA CRONICĂ EVOLUTIVĂ

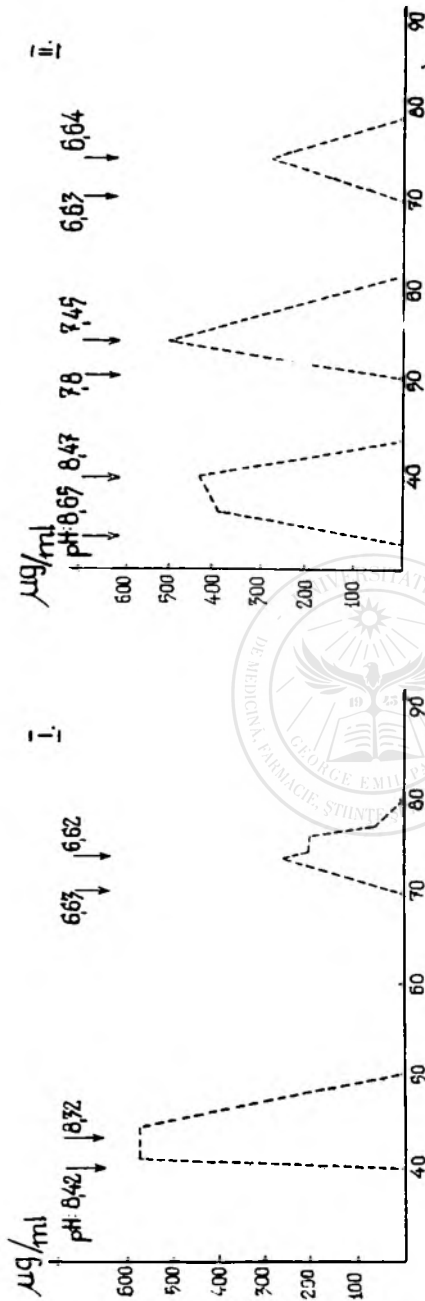


Fig. nr. 1: Valorile medii ale cromatogramelor fibrinogenului la 20 de persoane de control. Ordonată: concentrația proteinei. Abscisă: numărul fracțiunilor

Fig. nr. 2: Valorile medii ale cromatogramelor fibrinogenului la 16 bolnavi cu artrită reumatoidă. Ordonată: concentrația proteinei. Abscisă: numărul fracțiunilor

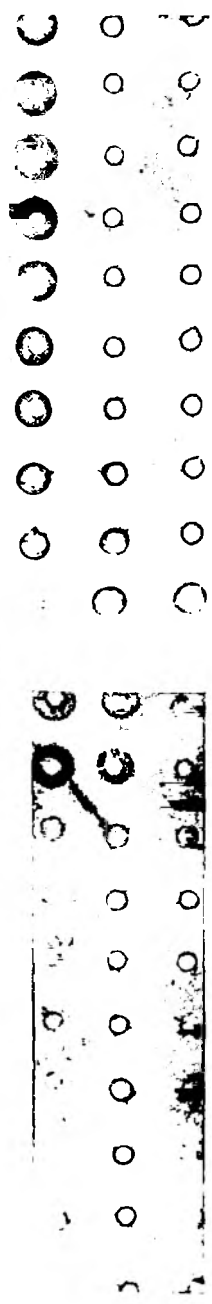


Fig. nr. 3: Fotografia testului Mancini al unui bolnav (a) și al unei persoane de control (b). Pe lame s-au aplicat numai soluțiile la care s-a pus în evidență prezența fibrinogenului prin testul de coagulare, precum și din eprubetele așezate imediat înainte și după eprubetele conținând proteine

crescând concentrația de sare și scăzând pH-ul tamponului. S-a folosit colectorul de fracțiune Nowator (R. P. Polonă). Experiențele s-au făcut la temperatura camerei.

1. Tampon start: 0,015 M glicină, pH = 9,0.

2. Tampon fosfat: 0,1 M, pH = 5,5.

Treptele de eluție:

1. Tampon start,

2. 2 volume tampon start + 1 volum tampon fosfat,

3. 1 volum tampon start + 2 volume tampon fosfat;

4. Tampon fosfat.

Din fiecare eluent s-a recoltat un volum de 150 ml, împărțit în 30 fracțiuni (total 120 de fracțiuni).

Proteinele s-au determinat din fiecare fracțiune cu metoda Folin-Lowry (cu citire la electrocolorimetru Zeiss) și din tuburile conținând proteine s-a identificat fibrinogenul prin coagularea cu trombină și prin testul lui Mancini (prin imunodifuziune) (10). Din eprubetele la care a început desprinderea unei fracțiuni s-a determinat pH-ul fracțiunilor (cu pH-metru tip MV-84, Clamann și Grahert, Dresden).

Rezultate

La lotul de control s-a reușit separarea celor două fracțiuni de fibrinogen. La desprinderea primului vîrf pH-ul este în medie de 8,32 (valori limite: 8,03—8,60). La desprinderea celui de al doilea vîrf media pH-ului este de 6,62 (valori limite: 6,18—6,95). Într-un singur caz a apărut vîrfurile al doilea la pH = 8,25. La cazurile de control s-au găsit numai două fracțiuni (fig. nr. 1).

În cazul bolnavilor cu artrită reumatoidă au apărut trei fracțiuni, între cele două fracțiuni apărute, la martori evidențiindu-se încă o fracțiune bine separată la pH-ul de 7,45 în medie (valori limite 7,10—7,95) (fig. nr. 2). Această fracțiune a lipsit numai la un bolnav. Pe de altă parte, ultima fracțiune a prezentat o curbă discontinuă la 4 bolnavi, aceasta divizându-se în două fracțiuni mai mici. Nici acest fenomen nu s-a observat în cazul fibrinogenului obținut de la martori.

Curbele de desprindere sînt alcătuite din valorile medii ale valorilor de determinare a proteinelor. Figura nr. 3 reprezintă fotografia testului Mancini (fibrina) patologic față de cel normal, constatîndu-se o rezistență a substratului față de sistemul enzimatic al fibrinolizei. Diferențe calitative s-au semnalat și la analiza polarografică a soluțiilor de fibrinogen, precum și la conținutul crescut în glucide al fibrinogenului patologic.

Discuții

Cu ocazia studiilor noastre anterioare asupra cazurilor de reumatism cronic, privind polimerizarea și liza fibrinei, am constatat scăderea vitezei acestor procese. Determinările cineticii enzimatică au semnalat comportarea diferită a substratului (fibrina) patologic față de cel normal, constatîndu-se o rezistență a substratului față de sistemul enzimatic al fibrinolizei. Diferențe calitative s-au semnalat și la analiza polarografică a soluțiilor de fibrinogen, precum și la conținutul crescut în glucide al fibrinogenului patologic.

Fibrinogenul indivizilor sănătoși se separă în două fracțiuni prin cromatografie pe coloană de DEAE-celuloză. În condiții identice, fibrinogenul bolnavilor suferind de artrită reumatoidă se împarte în trei fracțiuni cromatografice, — între cele două fracțiuni găsite și la martori mai apare o fracțiune. Această variantă „patologică” de moleculă în condițiile de separare mai sus amintite, este caracterizată printr-un pH de desprindere în medie de 7,45 pH. Fracțiunea este coagulabilă cu trombină și are o valoare imunologică completă.

Fenomenul observat la bolnavi cu artrită reumatoidă pledează pentru valabilitatea teoriei referitoare la biosinteza modificată a fibrinogenului în această boală, dar rămîne de studiat în ce măsură fracțiunea „patologică“ a fibrinogenului intervine în tulburările mecanismului enzimatic al fibrinogenării și al fibrinolizei observate în artrita reumatoidă.

Sosit la redacție: 3 iulie 1971.

Bibliografie

1. BLOMBÄCK B., BLOMBÄCK M.: *Nouv. Rév. Fr. d'Hémat.* (1970), 10 5, 671;
2. HEMKER H. C.: *Nouv. Rév. Fr. d'Hémat.* (1970), 10 5, 645;
3. JOSSO F., LAVERGNE J. M., SOULIER J. P.: *Nouv. Rév. Fr. d'Hémat.* (1970), 10 5, 633;
4. KÓTAY LAKATOS EVA, KIFOR I., FALL S.: *Rev. Med.* (1964), 2, 176;
5. KÓTAY LAKATOS EVA, KIFOR I., KIFOR OLGA: *Studii și Cerc. de Biochimie* (1967), 10, 4, 333;
6. KÓTAY LAKATOS EVA: *Rev. Med.* (1967), 13, 3—4, 294;
7. KÓTAY LAKATOS EVA, MÓDY J.: *Rev. Med.* (1968), 14, 1, 53;
8. KÓTAY LAKATOS EVA: *Rev. Med.* (1968), 14, 2, 163;
9. KÓTAY LAKATOS EVA: *Studii și Cerc. de Biochimie* (1968), 11, 2, 167;
10. MANCINI G., VAERMAN J. P., CARBONAVA A. O., HEREMANS J. T.: A single-radial-diffusion method for the imunological quantitation of proteins. In: Peeters H.: *Protides of the biological fluids*. Elsevier Publ. Co., Amsterdam, 1964;
11. MÉNACHÉ DORIS: *Congenitally Abnormal Fibrinogens*. Fibrinogen: Structural, Metabolic and Pathophysiologic Aspects. Sonderdruck. F. K. Schattauer, Stuttgart—New York, 1970, 307;
12. MÉNACHÉ DORIS: *Nouv. Rév. Fr. d'Hémat.* (1970), 10/5, 653;
13. MESTER L., SZABADOS L.: *Nouv. Rév. Fr. d'Hémat.* (1970), 10/5, 679;
14. MESTER L., SZABADOS LENKE, SORIA JEANETTE: *C. R. Acad. Sc., Paris* (1970), 271, 1813;
15. MESTER L.: *Bull. Soc. Chim. Biol., Paris* (1969), 51/4, 635;
16. MEYER D., DRAY L., LARRIEU M. J.: *Nouv. Rév. Fr. d'Hémat.* (1970), 10/5, 619;
17. MOESSON M. W.: *Molecular Heterogeneity of Human Fibrinogen*. Fibrinogen: Structural, Metabolic and Pathophysiologic Aspects. Sonderdruck., F. K. Schattauer, Stuttgart—New York, 1970, 63;
18. MOESSON M. W.: *High Solubility and Plasmin-Mediated Degradation Products*. Fibrinogen: Molecular, Metabolic and Pathophysiologic Aspects. Sonderdruck. F. K. Schattauer, Stuttgart—New York, 1970, 255;
19. RYBÁK M., BRADA Z., HAIŠ I. M.: Säulenchromatographie in Cellulose-Ionenaustauschern. Fischer, Jena, 1966, 260;
20. SAMAMA M., SORIA J., SORIA C.: *Nouv. Rév. Fr. d'Hémat.* (1970), 10/5, 666;
21. STOICHIȚA MICHAELA, CIOBANU V., TEICAN-GHEORGHIU M., VLĂDESCU C.: *Studii și Cerc. de Med. Int.* (1963), 1, 97.