

METODĂ SIMPLĂ PENTRU DETERMINAREA CONȚINUTULUI IN MUCOPOLIZAHARIDE NEUTRE AL SERULUI SANGUIN

Jenő Módy

În ultimii ani au apărut numeroase comunicări care se ocupă de semnificația modificărilor glucoproteinelor serice în diferite procese patologice (1, 2, 4, 5, 8, 14, 17, 19, 21). Dar interpretarea rezultatelor cercetărilor efectuate este în greutăți în mare măsură de faptul, că aceste rezultate au fost obținute cu ajutorul unor metode deosebite și că însăși metodele aplicate nu sînt suficient de precise.

Procedeele utilizate pînă astăzi pentru determinarea glucoproteinelor serice se bazează aproape exclusiv pe analiza filtratului seric deproteinizat (6, 7, 18, 22, 23). Cu toate acestea se știe că și în precipitatul proteic poate să rămîna o cantitate considerabilă de glucide fixate. Cercetările noastre au confirmat acest fapt. În schimb nu se cunoaște încă o metodă cu ajutorul căreia să se poată determina fracțiunile glucidice legate puternic de proteidele serice și rămase împreună cu precipitatul chiar după precipitarea proteică. Această constatare m-a determinat să elaborez o metodă aptă atît pentru determinarea conținutului în polizaharide care precipită împreună cu proteinele, cît și al celor care rămîn în soluție după precipitarea proteică.

Se știe că — hidrații de carbon fixați de proteinele serului sanguin sînt compuși din fracțiuni neutre și acide (3, 10, 15, 17). Fracțiunile neutre conțin hexoze, hexozamine și fucoză, iar fracțiunilor acide le aparțin acizii uronici și acidul neuraminic. Conținutul glucidic total al serului sanguin îl constituie de terminarea separată a fiecărui component amintit mai sus (17). Metodele aplicate pînă acum nu sînt suficiente de potrivite pentru efectuarea determinărilor curente, deoarece sînt complicate și necesită timp prea mult. În schimb, pentru punerea în evidență a conținutului glucidic relativ al fracțiunilor proteice obținute prin electroforeză pe hîrtie se utilizează cu succes încă de mult timp reacția Schiff consecutivă oxidării cu acid periodic (metoda P.A.S., 12, 16, 20, 24). Această reacție este caracteristică pentru mucopolizaharidele neutre. Colorația metacromatică cu albastru de toluidina consecutivă oxidării cu acid periodic respectiv cu brom a glucoproteidelor acide (metoda D.O.T.) 3, 10, 15 nu a dat rezultatele așteptate.

Numeroase examinări au aratat că în reacția Schiff intensitatea de colorație a spotului cu o cantitate de ser cunoscută ce s-a pipetat și uscat pe hîrtia de filtru este proporțională cu cantitatea de mucopolizaharide neutre, astfel încît poate constitui baza determinărilor cantitative.

Am folosit ca etalon serul persoanelor sănătoase. Pentru stabilirea exactă a acestuia am procedat la determinarea componentilor glucidici din serul procurat de la Centrul de colectare și conservare a sîngelui din țig. Mureș. Determinarea cantitativă a hexozelor și hexozaminelor, enumerate în categoria fracțiunilor neutre, am efectuat-o utilizînd metoda *Hirsch* (10). Pe baza a 10 analize executate paralel am constatat că cantitatea hexozelor este de 260 mg%, iar cea a hexozaminelor de 110 mg%. Determinarea conținutului în fructoză am făcut-o potrivit metodei descrise de *Jacubeit* și colab. (11), valoarea medie obținută fiind de 10 mg%. Totalizînd rezultatele parțiale de mai sus, am stabilit cantitatea de fracțiuni glucidice neutre din ser la valoarea de 380 mg%. Cantitatea de acizi uronici care formează fracțiunea se poate determina cu ajutorul metodei lui *Marogg* și colab. (13), iar cantitatea de acid neuraminic cu metoda lui *Hess* și colab. (9). Valoarea medie a acizilor uronici este de 10 mg%, iar a acidului neuraminic de 70 mg%, deci în total 80 mg%. Aceste valori împreună cu cele de mai sus sînt în concordanță cu datele existente în literatura (v. tabelul I.). Astfel valoarea medie a conținutului glucidic total din ser este de 460 mg%, din care 380 mg% reprezintă fracțiunile neutre, iar 80 mg% cele acide.

Tabelul Nr. 1.

Cantitatea în mg% a componentilor fracțiunilor polizaharidice neutre și acide ale serului sanguin.

	Neutre		Acide
hexoză	260 mg%	acid neuraminic	70 mg%
hexozamină	110 ..	acizi uronici	10 ..
fructoză	10 ..		
Total:	380 mg%		80 mg%

Din acest ser cu un conținut glucidic cunoscut am liofilizat 100 ml, introducînd cîte 5 ml în sticlute de penicilină, curate și uscate. Etalonul astfel pastrat nu se schimbă, putînd fi folosit ani de-a rîndul. În laboratoarele în care nu există posibilitatea de a se face liofilizarea, serul poate fi conservat în frigider. În asemenea cazuri, vom folosi ca standard de fiecare dată ser proaspăt. Reacția de culoare a acestuia se compară cu cea a serului utilizat anterior, adică determinăm conținutul glucidic cunoscînd concentrația serului inițial.

Prin urmare nu e necesar să se facă determinarea separată a componentilor glucidici decît într-un singur caz.

Metoda se practică în felul următor: Pipetăm și uscăm succesiv pe benzi de hîrtie de filtru cantități egale atît din serul standard al cărui conținut glucidic îl cunoaștem exact, cît și din serurile pe care vrem să le analizăm. Efectuăm apoi cu metoda PAS reacția de culoare a glucoproteinelor neutre. (Pentru punerea în evidență a fracțiunilor glucoproteice metoda DOT pe care am amintit-o nu s-a dovedit a fi practic aplicabilă. Intrucît însă modificările cantitative ale acidului neuraminic și acizilor hexuronici sînt mult mai mici, decît devierile fracțiunilor neutre, determinarea acestor din urmă satisface pe deplin cerințele practicii). Coloranții din spoturile de pe banda de hîrtie de filtru pot fi dizolvați, intensitatea de colorație a eluatelor e proporțională cu concentrația raportată la standard. Examinările de control efectuate pînă acum arată că limita

de eroare a metodei este de 2% (luind în considerare erorile datorate pipetării, eluției și extincției), ceea ce corespunde unei devieri de aprox. 6—8 mg.

Substanțele necesare pentru aplicarea metodei sînt: acidul periodic (care în lipsa unui produs de fabricație se poate prepara și în laborator) acetatul de Na p. a., tiosulfatul de Na p. a., iodura de K p. a., metabisulfitul de K p. a. acidul clorhidric concentrat, fuxina bazică sau neutră (la reactivul Schiff), alcool etilic 96% și acetona.

Aparatura necesară: micropipetă, hirtie de filtru, vas de colorație, fotometru (fotoelectric Lange sau Pulfrich).

Soluții necesare :

1. *Soluția de acid periodic :* se dizolvă 1,2 g acid periodic în 30 ml apă distilată, se adaugă 15 ml soluție de acetat de Na M/5 se amestecă și agitându-se mereu se toarnă 100 ml alcool etilic 96%. Soluția trebuie să fie întotdeauna *proaspătă*, deoarece se descompune repede;

2. *Soluție reductoare:* Se dizolvă 5 g tiosulfat de Na și 5 g iodura de K în 100 ml apă distilată, apoi agitându-se mereu se adaugă 150 ml alcool etilic 96%. Înainte de întrebuițare se pipetează la fiecare 250 ml de soluție 2,5 ml 2 NHCl.

3. *Reactiv Schiff:* se dizolvă 1,5 g fuxină bazică sau neutră în 200 ml apă distilată fierbinte, în timp ce se agită, se răcește cu apă de robinet pînă la 60°C, apoi se adaugă 1,5 g metabisulfitul de K și 3 ml acid clorhidric concentrat. Vasul se astupă cu un dop de cauciuc și se păstrează 16—18 ore în frigider. După aceea soluția se limpește cu 1 g cărbune activ și se filtrează. Filtratul trebuie să fie clar (dacă se utilizează diamantfuxină culoarea lui e portocalie, iar în lipsa unei acidulări suficiente-violetă). Reactivul Schiff încolor se poate păstra cîteva săptămîni în frigider, ferit de lumină.

4. *Soluția de spălat :* se dizolvă 8 g metabisulfitul de K în 800 ml apă distilată, după dizolvare se adaugă 10 ml acid clorhidric concentrat, apoi volumul soluției se întregește cu apă distilată pînă la 1000 ml.

5. Alcool etilic 70% apos.

Tehnica metodei.

Pe benzi de hirtie de filtru avînd o lărgime de 3 cm și o lungime corespunzătoare, pipetăm pe o lărgime de 4—6 mm și pe o distanță de aprox. 2,5 cm, 0,004 mm din serul de analizat, în așa fel încît primul loc să fie ocupat de soluția etalon, urmînd apoi într-o succesiune cunoscută spoturile serurilor pe care le examinăm. Pipetarea nu se poate face pe bandă de hirtie așezată pe placă de sticlă, deoarece o parte a serului ce se tamponează rămîne pe aceasta. În acest scop sînt indicate plăcile cu godeuri serologice care se utilizează la efectuarea reacțiilor în așa fel ca convexitatea plăcii să fie sub partea respectivă a benzii în timpul pipetării cu picături. În lipsa plăcilor cu godeuri pipetarea se va face pe o bandă de hirtie întinsă între două plăci de sticlă, în așa fel ca suprafața inferioară a hirtiei să nu atingă nici un obiect. După picătura etalon se pot pipeta altele soluții serice cîte dorim. Sursele de eroare se reduc dacă soluția etalon se pipetează nu într-un singur loc, ci cel puțin în trei locuri succesive, la calculul concentrației se va lua ca bază media proporțională a valorilor de extincție ale acestor locuri. Benzile cu spoturi se usucă timp de 10 minute la 150°C. Între timp hidratații de carbon împreună cu proteinele se fixează de hirtie în așa măsură încît nici spălăturile repetate nu vor putea să elueze o cantitate evidențiabilă. (Colectînd lichidul de spălare și evaporîndu-l pînă la o concentrație de o mie de ori mai mare, nu am reușit să punem în evidență zahăr sau derivați glucidici nici pe cale chimică și nici prin cromatografie). Uscarea benzilor la o temperatură sub 150°C, de exemplu la temperatura camerei, este insuficientă.

Benziile uscate se introduc într-un vas de colorație curat (dacă e posibil de porțelan sau de sticlă) și trunăm peste ele timp de 10 minute o soluție de acid periodic proaspăt preparat. Respectarea timpului de oxidare este foarte importantă: o oxidare îndelungată sau insuficientă tulbură citirea rezultatelor. După 10 minute turnăm soluția de acid periodic într-un vas colector (regenerare de etanol!) și spălăm benziile de trei ori cu o cantitate mai mică de alcool etilic 70%. Chiar după spălare cu alcool pe benzi mai rămâne încă puțin acid periodic pe care îl îndepărtăm cu soluția reducătoare.

Luăm 250 ml soluție alcoolică de tiosulfat de Na și iodură de K preparată în prealabil, la care adăugăm 2,5 ml. 2NHCl, o turnăm peste benzi. Lăsând-o timp de 8 minute. După aceea spălăm benziile din nou cu alcool etilic 70%, ca mai sus. După a treia spălare cu alcool, turnăm reactiv Schiff peste benziile incolore, aranjându-le cu pensa astfel încât să nu stea una peste alta timp mai îndelungat deoarece acest fapt tulbură reacția de culoare. Colorarea durează 40 de minute, după care turnăm reactivul, spălăm benziile cu soluția de sulfat de trei ori, timp de 5 minute, le deshidratăm cu acetonă 1—2 minute și le uscăm pe placă de sticlă. Baza hirtiei e incoloră, spoturile sînt de un roșu viu, diferențele mari de concentrație pot fi observate și cu ochiul liber).

Citirea rezultatelor.

Corespunzător spoturilor colorate benziile de hirtie, uscate, se taie cu iofarfa, iar diferitele părți se introduc în eprubete marcate. Pentru eluare se pipetează în fiecare eprubetă 5 ml soluție de N NaOH și așezăm eprubetele timp de 20 de minute pe baie de apă la 70°C. După aceasta pipetăm în fiecare eprubetă, fără răcire 5 ml alcool etilic absolut și agităm citeva minute. Conținutul eprubetelor este complet incolor. În continuare răcim eprubetele cu apă de robinet, adăugînd în fiecare 1 ml acid acetic glacial și agităm; culoarea roșie ce apare e intensă și durabilă. Valorile de extincție le citim în fotometrul Pulfrich sau Lange în raport cu apa distilată. Concentrația o exprimăm în mg% făcînd raportul față de media procentuală a valorilor de extincție ale picăturilor etalon (conținutul în mucopolizaharide neutre al serului etalon utilizat de noi a fost de 380 mg%).

Metoda poate fi aplicată cu succes atît în laboratoarele de cercetări cit și în cele clinice.

Concluzii: Intensitatea reacției de culoare P.A.S. a spoturilor de ser sanguin uscate pe hirtie de filtru este proporțională cu cantitatea de mucopolizaharide neutre din ser. Astfel, dacă măsurăm în fotometru valorile de extincție ale coloranților eluați și le comparăm cu cele ale serului etalon conservat al cărui conținut în glucide îl cunoaștem, putem stabili destul de precis cantitatea de gluco-proteine din serul analizat. Această metodă poate fi utilizată curent mai ales la efectuarea determinărilor clinice și de laborator.

Sosit la redacție: 27 februarie 1960.

Bibliografie

1. ALPERN D. O.: *Ukrain. Biohim. Zsurn.* 27, 3, 252 (1955); 2. BABKINA M. V.: *Ter. Arh.* 3, 72 (1956); 3. BENHAMOU E., PUGLIESE J., CHICHE J., AMOUCH P.: *Presse Méd.* 651 (1954); 4. BLIX G.: *Scand. J. Clin. Lab. Inv.* 10, Suppl. 31, 128 (1957); 5. CEAZOV E. I.: *An. Rom. Sovi.* 1, 132 (1957); 6. DISCHE Z., OSNOS M.: *Fed. Proc.* 11, 203 (1952); 7. FOLDES J.: *Kisér. Orvostud.* 11, 1, 1 (1959); 8. GREENSPAN E. M.: *Advances in int. Med.* 7, 101 (1955); 9. HESS E. L., COBURN A. F., BATTES R. C., MURPHY P.: *J. of Clin. Inv.* 36, 3, 449 (1957); 10. HIRSCH A.: *Klin. Wschr.* 35, 1, 26 (1957); 11. JACUBEIT M., BRÜNGER P., KNEDEL M.: *Klin. Wschr.* 37, 8, 460 (1959); 12. KOIW S., GRÖNWALL A.: *Scand. J. Clin. Lab. Inv.* 4, 244 (1952); 13. MAROGG J., WEGMANN J.: *Schw. Med. Wschr.* 89, 345 (1959); 14. MIHAESCU

C.: *Medicina Int.* 9, 1295 (1958); 15. RIENTIS K.: *Bich. J.* 53, 79 (1953); 16. ROMANI J.: *C. R. Biol. Paris* 148, 1069 (1954); 17. SCHULZE H. E.: *Dtsch. Med. Wschr.* 83, 39, 1742 (1958); 18. STARY Z., YUVANIDIS M.: *Bioch. Zschr.* 324, 206 (1953); 19. STARY Z.: *Clin. Chem.* 3, 4, 557 (1957); 20. TODOROV J., KARAKASEV A.: *Sovr. Med.* 6, 7 (1956); 21. WINZLER R. J.: *CIBA Symposium on Chemistry and Biology of Mucopolysaccharides*. J. & A. Churchill, London. (1958) p. 263; 22. WINZLER R. J.: *Meth. Biochem. Anal.* Vol. II. 279 (1955); 23. WINZLER R. J., DEVOR A. W., MEHL J. W., SMYTH I. M.: *J. Clin. Invest.* 27, 609 (1948); 24. WUNDERLY CH., PHILLER S.: *Klin. Wschr.* 32, 17—18, 425 (1954).

ПРОСТОЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ НЕЙТРАЛЬНЫХ МУКОПОЛИСАХАРИДОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ

Моди Е.

Интенсивность окраски капанного и высушенного на фильтровальной бумаге пятна сыворотки и ПАСК прямо пропорциональна количеству нейтральных мукополисахаридов сыворотки. О количестве глюкпротеидов в сыворотке достаточно точно можно судить, сравнивая экстинцию элюированной краски при фотометрии со стандартной консервированной сывороткой с известным количеством углеводов в ней.

Этот метод для целей ежедневных клинических, лабораторных определений особенно пригоден.

MÉTHODE SIMPLE POUR LA DÉTERMINATION DU CONTENU EN MUCO-POLYSACCHARIDES NEUTRES DU SÉRUM SANGUIN

J. Mody

L'intensité de la réaction de couleur PAS que donne une tache sérique gouttée et séchée sur papier filtre est proportionnelle à la quantité de muco-polysaccharides neutres du sérum. Étant donné ce fait, si on compare les valeurs d'extinction des solutions élues et mesurées dans le photomètre, aux valeurs du sérum étalon conservé, dont la teneur en hydrate de charbon est connue, on peut obtenir des indications assez précises en ce qui concerne la quantité de glycoprotéides du sérum. Ce procédé est applicable comme méthode usuelle surtout dans les déterminations cliniques et de laboratoire.