

GLICOPROTEINELE ȘI MUCOPOLIZAHARIDELE PLASMEI SANGUINE

I. Mody

Proteinele plasmatică conțin nu numai acizi aminați și hidrați de carbon. Acest fapt se cunoaște de mult: în anul 1892 *Freund* a relatat diferențierea „gumelor amonale” ca produse de dezagregare hidrolitică ale proteinelor plasmatică. *Mörner* (1893) și *Zanetti* (1897) fracționând globulinele au obținut produse de dezagregare cu proprietăți reducătoare. În anul 1913 *Lépine* a descris „fracțiunea labilă” conținând hidrați de carbon ai proteinelor plasmatică. În anul 1903 *Abderhalden* a arătat că spre deosebire de globuline albumina cristalizată nu dă proba Molish. Pe baza determinării conținutului în hidrați de carbon ai fracțiilor proteinice din plasmă, *Lustig* și *Ilaas* (1931) și *Hezitt* (1938) au pus în evidență conținutul în hidrați de carbon mai redus al albuminelor (0,78%) și mai ridicat al globulinelor (3,3%).

Cunoștințele referitoare la structura mucopolizaharidelor și glicoproteinelor au fost prezentate pentru prima oară de *Levene* în anul 1930. În ultimele două decenii au fost acumulate numeroase date importante dintre care o mare parte au aruncat lumină asupra compoziției chimice, a proprietăților și importanței fiziologice și patologice a mucopolizaharidelor și a glicoproteinelor. În felul acesta a devenit evident că între conținutul în hidrați de carbon ai proteinelor plasmatică și unele stări patologice există o corelație. Faptul acesta a făcut ca cercetarea mucopolizaharidelor (de aici înainte: MPZ (și glicoproteinelor) de aici înainte: GP) să fie efectuată cu un deosebit interes.

Dar tocmai numărul mare al acestor cercetări și diversitatea metodei aplicate explică lipsa unei clasificări și denumiri unitare a proteinelor conținând hidrați de carbon. Începând din anul 1938 clasificarea lui *Meyer* s-a extins din ce în ce mai mult. *Meyer* împarte MPZ în două grupe: mucoproteine și glicoproteine. Mucopolizaharidele sînt hidrați de carbon polimerizați cu moleculă mare, fracția lor neutră este formată în mare parte din hexozamine, iar fracția lor acidă conține pe lângă aceasta acizi uronici și acid sulfuric. Mucoproteinele și glicoproteinele sînt proteine cu conținut glucidic; în primele predomină componentul hidraților de carbon, iar în celelalte componentul proteic. În cadrul glicoproteinelor, *Meyer* a diferențiat pe baza conținutului în hexozamină grupa glucozidelor cu un conținut în hexozamină mai mic de 4% și grupa mucozilor cu un conținut de hexozamină mai mare de 4%. Această clasificare impune modificări din ce în ce mai evidente în lumina examinărilor

mai moderne și mai precise. Recent a câștigat teren clasificarea lui *Sudhof și Kellner*. Acești autori au denumit mucoide fracția cu un conținut abundent în hidrați de carbon ai proteinelor plasmatiche, solubilă în precipitanți proteici, în timp ce fracția precipitată cu un conținut redus în hidrați de carbon este formată din glicoproteine. Acestea din urmă se împart în oligo-glicoproteine și poli-glicoproteine.

În ceea ce privește compoziția părții zaharidice din glicoproteine și mucoide, *Zanetti* a izolat în 1903 glucozamina fixată de proteinele serice în forma unor derivați tetra-benzoilici. Conținutul în manoză și galactoză al hidrolizatului proteic a fost determinat în 1923 de *Bierry* ca o sazonă fenilică respectiv metil-fenilică. Cercetările lui *Sørensen și Haugaard* (1933) au arătat că în mucoproteinele serice raportul dintre galactoză și manoză este egal cu 1:1. În 1952 *Werner și Odin* au pus în evidență în hidrolizatele mucoproteice, hexosamine, manoză și galactoză cu ajutorul cromatografiei. „Fracția rapidă” a cromatogramei s-a dovedit a fi fucoză. (*Waldron, 1950*).

Pe baza examinărilor întreprinse pînă acum se pare că dintre fracțiile plasmatiche alcătuite din acizi uronici și acid neuraminic respectiv sialinic numai aceștia din urmă se combină direct cu proteinele. Acizii uronici sînt conținuți în albumină într-o legătură labilă îndeplinind funcție de transport legați de bilirubină.

Referitor la natura legăturii dintre hidrații de carbon și proteine nu dispunem încă de cunoștințe certe. Este foarte probabil că componentul glucidic și proteic se leagă prin intermediul glucozaminei, (*Masamune, 1955*), cu toate că nu poate fi exclus nici rolul grupelor OH de treonină și serină (*Grassmann și colab, 1957*) precum nici rolul carboxililor liberi. Cu ajutorul unor metode adecvate, din hidrolizatele proteice și de mucină se pot obține glicopeptide care după *Masamune* conțin nu numai acizi oxo-aminiici, ci și acid glutamic și acid aspartic. Componentul constant al tuturor glicopeptidelor este glucozamina, în timp ce acidul sialinic și fucoza nu se găsesc cu regularitate. Faptul că fucoza și acidul sialinic devin liberi chiar și la cea mai ușoară hidrolizare a proteinelor, indică poziția terminală a acestor componente. Luînd în considerare toate acestea este foarte probabil că printre componenții hidraților de carbon ai glicoproteinelor pot figura deopotrivă atât oligozaharidele cit și polizaharidele.

Spre deosebire de legăturile stabile covalente amintite mai sus ale glicoproteinelor plasmatiche, în structura mucopolizaharidelor acide (componentii substanței fundamentale a țesutului conjunctiv: acidul hialuronic, acidul condroitin sulfuric etc.) domină tipurile de legătură heteropolară, fapt care explică clar caracterul lor mai labil. Nu trebuie să uităm însă că la interpretarea proprietăților proteinelor plasmatiche ar fi nejudicios să luăm în considerare „numai” însușirile părții proteice sau „numai” cele ale părții glucidice, respectiv lipidice. În sistemul coloidal al plasmii sanguine proteinele, hidrații de carbon și lipidele, sînt prezente nu izolate unele de celelalte ci într-o strînsă legătură și interacțiune sub formă de complexe glico-lipo-proteice. Particularitățile lor apar corespunzător diferențelor cantitative și calitative pe care le prezintă acești componenți.

Glicoproteinele formează în plasmă mai multe fracții. Pentru determinarea cantitativă a acestora au fost elaborate numeroase procedee. Cea mai răspîndită metodă este a lui *Winzler*. Principiul acestui procedeu constă în faptul că tratînd serul cu precipitanți proteici (acid sulfosalicilic, acid tricloracetic, acid percloric) proteinele plasmatiche precipită, în timp ce așa-numita fracție „oroso-mucoidă” nu precipită. Mucoproteidele dizolvate în filtrat precipită cantitativ cu acidul fosfotungstic. Cantitatea lor poate fi determinată pe baza conținutului în proteine sau hidrați de carbon. Din cauza caracterului ei mai simplu, prima metodă s-a dovedit a fi mai operativă; cantitatea părții proteice poate fi dedusă cu ajutorul metodei biuret, sau pe baza conținutului în tirozină, datorită reacției de culoare pe care o dă cu reactivul *Folin-Ciocalteu*.

S-a constatat că cantitatea mucoproteinelor solubile în precipitanți proteici variază în funcție de vîrstă și sex. Spre deosebire de celelalte mamifere, la om această cantitate este foarte redusă după naștere. În singele vițelilor non-născuți se poate pune în evidență o mare cantitate de mucoproteină specifică denumită fetuină. *Winzler* a arătat că în serul

unei femei adulte sănătoase se găsește o cantitate de 40—70 mgr % mucoproteine, iar în cel al unui bărbat adult sănătos 50—75 mgr %. Este interesant de remarcat, că această cantitate se schimbă în diferitele perioade ale zilei, nivelul cel mai ridicat constatându-se în orele de după masă. Substanțele pirogene și ACTH, fac să crească persistent cantitatea de mucoproteine, iar parathormonul provoacă o creștere pasageră a nivelului de glicoproteine.

Glicoproteinele prezintă o cantitate deosebit de ridicată în procesele reumatismale, în afecțiunile cardiovasculare și în bolile infecțioase. Cu toate că pe această bază cancerul nu poate fi diagnosticat, trebuie să amintim că nivelul de orșo-mucoide este în general scăzut în cazul tumorilor maligne, iar în mueloame este în schimb crescut. Afecțiunile renale ca glomerulo-nefrita difuză acută, ca și faza uremică a nefrosclerozei sînt însoțite de obicei de o creștere a cantității de glicoproteine serice. În schimb, în pseudo-nefroză cantitatea de glicoproteine serice înregistrează a scădere caracteristică, necrescînd decît atunci cînd boala trece în nefrită. Acest fapt are o valoare diagnostică. În nefroza amiloidă cantitatea de GP serice este mai crescută în ciuda proteinuriei considerabile.

Dintre îmbolnăvirile sistemului endocrin tulburările hipofizare și ale glandelor suprarenale precum și cele tiroidiene sau ale insulelor lui *Langerhans* sînt însoțite în primul rînd de modificări ale nivelului GP serice. Cantitatea de GP este foarte redusă în boala lui *Simmonds* și *Addison*. În asemenea cazuri, administrarea de ACTH respectiv de hormonii cortico-suprarenali face să crească nivelul GP plasmatic.

Acest nivel prezintă modificări caracteristice în afecțiunile ficatului și ale căilor biliare. În hepatita epidemică, în hepatita serică omologă, în afecțiunile hepatice toxice, în ciroza hepatică portală și în general în toate cazurile de leziune a celulei hepatice se observă o diminuare pronunțată. În icterul mecanic însă cantitatea de GP este mai mare în-deosebi dacă obturarea este cauzată de un proces malign. O modificare similară a GP serice se constată și în metastazele hepatice tumorale. Întrucît în alte procese patologice nu se observă decît rareori o scădere a glicoproteinemiei asemănătoare celei din hepatită, determinarea lor este valoroasă pentru stabilirea diagnosticului diferențial. Coroborînd această determinare cu rezultatele celorlalte examene funcționale ale ficatului și ale probelor de precipitare-floculare, pronosticul bolii poate fi apreciat cu mai multă siguranță. GP au un rol hotărîtor în producerea activității polarografice a filtratului seric. De aceea determinarea lor cantitativă poate înlocui cu succes și acest procedeu de diagnostic valoros care impune o aparatură specială.

În cursul cercetărilor noastre în silicoza clinică și în intoxicația acută cu acid silicic provocată la animale de experiență am observat creșterea conținutului glucidic al fracțiilor proteice puse în evidență cu ajutorul electroforezei.

O altă fracție a glicoproteinelor plasmatică este „globulina fazei acute” sau proteina C-reactivă (PCR). *Tillet* și *Francis* au observat în 1930 că serul bolnavilor suferînd de diferite afecțiuni inflamatoare precipita cu polizaharida C somatică a pneumococilor. Mai tîrziu s-a constatat că și această proteină are un conținut glucidic fiind prezentă în cazuri de tumoare malignă ca și în anumite îmbolnăviri de sistem (bolile colagenului, vicii cardiace, ateromatoze, hipertonic, obezitate, alergii, șoc). Față de anticorpii adevărați poate fi pusă în evidență într-un interval scurt după debutul afecțiunii. Astfel de exemplu în infarctul cardiac, în prezența hiperlipemiei și a creșterii cantității beta-lipoproteinelor, această globulină este patognomonică chiar după 6—8 ore. În serul persoanelor sănătoase, ea nu se găsește de loc sau numai rareori. În serul patologic globulina fazei acute migrează în cursul electroforezei împreună cu alfa-2 globulinele. Cristalizează în plăci romboide. În general cantitatea ei este proporțională cu modificările cantitative ale GP.

Haptoglobina, o altă fracție plasmatică conținînd hidrați de carbon, a fost pusă în evidență de *Jayle* în 1939. Ea aparține alfa-globulinelor și intensifică acțiunea peroxidazică a hemoglobinei. Greutatea ei moleculară este de aproximativ 150.000, iar partea ei glucidică conține galactoză, manoză, hexozamine și acid sialinic. La fel ca și PCR, cantitatea ei crește în plasmă în cursul proceselor inflamatoare: *Jayle* consideră patognomonic acest

fapt mai ales în miocardul cardiac. Nivelul plasmatic este în general proporțional cu gravitatea afecțiunii.

Anumite GP ale plasmelor sanguine au rol în procesul de coagulare a sângelui și în unele reacții imunologice GP obținute din plasma umană și din urină inhibă hemoaglutinarea virală și coagularea sanguină. Efectul lor este asemănător cu cel al heparinei fiind însă mai puțin intens: 100—110 mg de mucoproteină au un efect identic cu 1 mg heparină. Cu albastrul de toluidină, MPZ acide colorabile metacromatice legându-se de profamină suspendă efectul antiheparinic al acestora. Acest fapt pledează de asemenea pentru efectul analog respectiv pentru antagonismul competitiv. Specificitatea substanțelor din grupele sanguine derivă de asemenea din prezența MPZ.

În ceea ce privește conținutul glucidic al proteinelor plasmatiche, cu ajutorul fracționării sulfatului de Na se pot obține din plasmă două fracții de GP. Acestea conțin o parte aproximativ egală din conținutul glucidic total. Odată cu perfecționarea procedeele fizico-chimice de fracționare a proteinelor au apărut condiții mai bune și pentru studierea conținutului fracțiilor proteinice. Glucidele legate de fracțiile proteinice au fost determinate în anul 1941 de *Blix* și colaboratorii cu ajutorul electroforezei. Procedeele lor necesită însă o aparatură complicată și o celulă de electroforetizare preparativă, și tocmai de aceea nu este indicat pentru examenele curente. Aceleași observații se pot face și în legătură cu procedeele de precipitare salină a lui *Cohn* sau cu procedeele de fracționare prin ultracentrifugare. În acest domeniu un progres considerabil l-a marcat studiul conținutului glucidic al proteinelor plasmatiche separate cu ajutorul electroforezei pe hirtie. Reacția *Hotchkiss—Mc Manus* utilizată în histologie a fost aplicată pentru prima oară la electroforeza pe hirtie de *Köiw* și *Gronwal*. Tehnica procedeuului este următoare: oxidând cu acid periodic fracțiile proteinice separate pe fișurile de hirtie de filtru grupele OH libere ale componentilor glucidici ale acestor fracții devin grupe cetonice sub efectul cărora leucofloxina sulfatică (reactivul *Schiff*) se înroșește din nou. Intensitatea culorii roșii ce apare este proporțională cu cantitatea MPZ neutre (atomi de C substituiți și radicali carboxilici nu reacționează). Pentru punerea în evidență a acestora din urmă se aplică procedeele metacromatice cu albastrul de toluidină al lui *Rientis*: dacă după acidul periodic continuăm oxidarea cu apă de brom, grupele carbonilice se oxidează devenind carboxili, iar produsul apărut se poate colora cu albastru de toluidină. Prima metodă este denumită „PAS”, iar cealaltă „DOT”. Cu ajutorul lor se poate determina conținutul total în mucoproteine (neutre+acide) al fracțiilor proteinice ale plasmelor. Valorile normale sînt următoarele:

Metoda	alb.	alfa-1	alfa-2	beta	gamma: % relativ
PAS	16—18	14—16	28—30	22—24	18—22
DOT	36—38	4—6	12—14	16—18	18—22

Valorile de mai sus corespund însă numai conținutului glucidic relativ al fracțiilor proteinelor plasmatiche, iar modificările lor nu pot fi acceptate decât cu rezervă, dată fiind lipsa unui procedeu apt pentru determinarea conținutului total al plasmelor în MPZ. Pînă acum această determinare este posibilă numai prin determinarea în parte a componentilor MPZ, hexoze, hexozamine fucoză, acid sialinic, acizi uronici, și prin totalizarea rezultatelor parțiale. Diferitele procedee elaborate sînt complicate, anevoie de executat și nu sînt indicate pentru determinări curente. Tocmai acest fapt a impus necesitatea elaborării unei metode în vederea determinării conținutului total în MPZ al plasmelor sanguine. Procedeele elaborate de noi constă în faptul că reacția de culoare cu iuxină, respectiv cu albastru de toluidină se efectuează nu în eprubetă ci pe hirtie de filtru ca și la metoda electroforetică, pe un spot de plasmă uscată care conține o cantitate cunoscută (0,004 ml). Coloranții se eluează din spoturile colorate obținute și se compară în fotometru cu intensitatea reacției de culoare a unei plasmă al cărei conținut este cunoscut. Suma determinărilor parțiale exprimată în valoare medie a conținutului glucidic al plasmelor etalon s-a dovedit a fi în medie

de 460 mg%, din care 380 mg% corespund fracțiilor „neutre” și 80 mg% fracțiilor „acide”. Acest procedeu verificat prin numeroase experiențe moștră și de control, de rezultate care pot fi bine reproduse fiind în același timp foarte indicat pentru determinările curente din laboratoarele clinice. Studiarea lui pe un material clinic mai vast este în curs de deslășurare.

Conținutul în GP al lichidului cefalo-rahidian este corespunzător conținutului proteic cu mult mai redus decit cel al serului (aproximativ 7 mg%), dar în partea glucidică proporția dintre hexoze și hexozamine este mai mare. Modificările GP din lichidul c. r. sînt în general paralele cu modificările GP serice. În schimb, în hipoproteinemie conținutul în GP al lichidului crește și în neuroză de exemplu prezintă o valoare de 6—7 ori mai mare decit cea normală.

În urina normală se găsește o cantitate suficientă de mucoproteine. În unele procese patologice această cantitate crește. Urina eliminată timp de 24 de ore de o persoană sănătoasă conține aproximativ 30 mg hexozamină, 38 mg hexoză, 6 mg lucoză și 5—6 mg acid hixuronic. Foarte probabil că o bună parte a mucoproteinelor extrase din urină cu ajutorul diferitelor metode deriva din mucoasa căilor urinare. În schimb una din fracțiile mucoproteice caracteristice ale urinei are rol în provocarea barajului *Donaggio*: în urina normală, adăugînd niolibdenat de amoniu și tionină apare un precipitat violaceu. Această reacție este inhibată în urina evacuată în cursul activității musculare. Apariția reacției este impiedicată de o fracție mucoproteică cu un conținut glucidic de aproximativ 25% din care s-au izolat galactoză, hexoamine, acetilice, lucoză, manoză, glucoză și acizi uronici. Intensitatea inhibiției este proporțională cu cantitatea fracției mucoproteice (*Tayeau*, 1954). Fără îndoială că o parte a mucoproteinelor din urină au un rol în patogenia calculozei renale, în timp ce o altă parte exercită tocmai un efect stabilizant.

— În ceea ce privește originea mucoproteinelor se știe că substanța fundamentală a țesutului conjunctiv este formată din acid hialuronic și acid condroitin sulfuric. Ambele substanțe sînt alcătuite din componenți glucidici intens polimerizați și cu caracter acid a căror proprietate caracteristică este cromofobia histologică. În schimb, membrana de bază a țesutului epitelial și stratul subendotelial al vaselor se colorează caracteristic metacromatic cu coloranți bazici, dînd reacția *Hotchkiss—McManus*. Așa cum s-a stabilit, acest fenomen este în legătură cu gradul diminuat de polimerizare a substanței fundamentale, pînă în pus în evidență întotdeauna nu numai în cursul regenerării țesulare, ci și în cursul proceselor de dezagregare. S-a dovedit de asemenea că proliferarea țesutului conjunctiv este însoțită de înmulțirea locală a substanței pozitive *Hotchkiss—Manus* și de creșterea cantității mucoproteinelor serice. Se știe încă de mult că în bolile colagenului, în cursul leziunilor tumorale, inflamatorii, înmulțirea locală a substanței pozitive *Hotchkiss—McManus* este însoțită de creșterea cantitativă a alfa-glicoproteinelor serice. Și în cazul persistenței tumorilor grefate pe animale de experiențe, apare local substanța pozitivă *Hotchkiss—McManus* odată cu creșterea paralelă a nivelului glicoproteinelor serice. Același fenomen se observă și la excitația locală a țesutului conjunctiv prin administrare de fuxină, ulei de terebentină, formalină, streptochinază, lizozimă, heteroproteină, la fracturile osoase etc. Faptele de mai sus confirmă teoria lui *Gersch* și *Catchpole* după care glicoproteinele serice își au originea în țesutul conjunctiv. Datorită pe de o parte depolimerizării substanței fundamentale, iar pe de altă parte activității intense a celulelor țesutului conjunctiv, mucoproteinele pătrund cu ușurință și prin perețele capilarelor intacte și mai cu seamă prin perețele țapilarelor cu leziuni de origine inflamatoare. Studiarea tulburărilor metabolice al MPZ au aruncat lumină și asupra patomecanismului proceselor degenerative însoțite de depuneri hialinice și amiloide. Azi cunoaștem deja unele date: mucoproteinele țesulare nu conțin acid neuraminic, dar în amiloidul depus în ficat se pot pune în evidență numeroși acizi metoxi-neuraminici. Este foarte probabil că depunerea în țesuturi a hialinei și a amiloidului constituie rezultatul unui proces identic cu cel al creșterii nivelului mucoproteinelor serice.

Procesele de reglare a nivelului glicoproteinelor serice sînt mai puțin cunoscute. Pare probabil că proteinele plasmactice normale pot fixa o cantitate determinată de hidrați de carbon, astfel încît nivelul glicoproteinelor se acomodează în general modificărilor frac-

țurilor proteice. Scăderea glicoproteinelor serice ce se instalează caracteristic în cursul leziunii celulei hepatice, se poate explica prin producerea unor fracții globulinice patologice modificate adică avînd o capacitate redusă de a fixa hidrații de carbon. În acest domeniu cunoaștem puține lucruri despre rolul sistemului nervos, probabil că trebuie luați în considerare centrul metabolic din hipotalamus. Unele date în legătură cu reglarea endocrină par a fi mai precise. *Selye* susține că somatotropina intensifică producerea de substanță fundamentală, iar ACTH și cortizonul o împiedică. Corticoidii minerali stimulează proliferarea, iar glicocorticoidii au un efect inhibitor. Mucoproteinele substanței fundamentale se produc probabil în mastocite. Acestea ar fi punctele de atac ale hormonilor cortico-suprarenali. *Nageotte* și *Ragan* accentuează rolul fibrocitelor. Probabil că în producerea fibronoidelor, amiloidei și hialinei există fenomene similare. Această presupunere este susținută și de pozitivitatea reacției *Hotchkiss—McManus*. Sub acțiunea para-hormonului substanța fundamentală osoasă și cartilajinoasă se depolimerizează: cantitatea glicoproteinelor crește atât în ser, cît și în urină. Datele cunoscute pînă acum arată că ficatul are nu numai un rol indirect în metabolismul hormonilor activi ai țesutului conjunctiv, ci și un rol direct în reglarea nivelului seric.

În încheiere se poate afirma că studierea MPZ și a glicoproteinelor oferă date valoroase atât din punct de vedere teoretic biochimic cît și pentru activitatea clinică de practică medicală. Rezultatele determinărilor mucoproteinelor efectuate în laboratoarele clinice înseamnă un ajutor util în anumite condiții la stabilirea diagnosticului, a diagnosticului diferențial și a pronosticului.

Sosit la redacție: 13 ianuarie 1960.

Bibliografia la autor.