

CONTRIBUȚII LA STUDIUL EXPERIMENTAL AL GLUCOPROTEINELOR PLASMATICE

E. Módy

Glucoproteinele îndeplinesc în organism funcții multiple, nespecifice și specifice. Au un rol structural atât în formarea substanței fundamentale tisulare, cât și în determinarea structurii proteinelor din plasmă, resp. din alte lichide biologice. Participă la apărarea nespecifică și specifică a organismului. Iau parte activă în transportul prin sânge al diferitelor substanțe exogene și endogene, sub forma unor fracțiuni glucoproteice cu structură și proprietăți determinate. Pe lângă acestea au și un rol nutritiv.

Studiul lor cantitativ și calitativ, precum și urmărirea modificărilor glucoproteinelor ajută într-o măsură considerabilă la stabilirea diagnosticului și a prognosticului la un mare număr de îmbolnăviri.

Pe baza reacției de culoare, dată cu reactivul Schiff de către glucidele oxidate cu acid. periodic, s-a elaborat o metodă cantitativă simplă pentru dozarea gluco-proteinelor neutre totale din plasmă. Principiul metodei este următorul: cu ajutorul unei micropipete se aplică pe o fișie de hirtie de filtru (cu dimensiune de 4×16 cm) câte 0,025 ml de soluție de analizat (ser, plasmă sau alt lichid biologic). Fetele se usucă la etuvă (150°C), apoi se efectuează reacția PAS pentru punerea în evidență a glucoproteinelor neutre. Intensitatea colorației roșii fiind direct proporțională cu cantitatea componentelor glucidici, prin determinarea cantității colorantului roșu se determină de fapt cantitatea totală a glucidelor neutre legate de proteine din materialul de analizat. Ca etalon servește un ser (liofilizat sau conservat la frigifer) cu un conținut cunoscut în glucide neutre. Citirea rezultatelor se face fie prin eluție și fotometrie, fie prin fotometrie directă cu evaluarea automată (fig. nr. 1). Valoarea medie a glucidelor neutre totale legate de proteinele serului uman este de 380 mg% (fig. nr. 1).

Folosind această metodă proprie (în comparație cu altele de uz curent) s-au urmărit modificările glucoproteinelor în diferitele faze ale evoluției disproteinemiilor experimentale, stabilind următorul plan de cercetare:

1. — Experimentarea unei metode corespunzătoare pentru provocarea disproteinemiei generale la animalele de experiență.

2. — Urmărirea modificărilor proteinelor și glucoproteinelor plasmatice la animale de experiență în diferite faze ale evoluției disproteinemiei:

a) studiul modificărilor așa zisei „faze nespecifice acute”, resp. ale fazei de evoluție cronică și ale celei de regenerare;

b) urmărirea acțiunii unor agenți glucidici activi, cu efecte toxice puternice, ca BCG, extracte de helminți, extract de creier heterolog;

c) urmărirea acțiunii unor medicamente antiflogistice (Streptomicina, PAS, HIN, Tebezonul);

d) urmărirea rolului reglator al unor glande endocrine (hipofiza, corticosuprar-renalele);

e) cercetarea locului de formare al glucoproteinelor: ficat, teritoriul splanchnic, splină, prin studiul comparativ al glucoproteinelor din sincele periferic, hepatic și portal, precum și din limfă.

Experiențele s-au efectuat pe șobolani albi, cobai, iepuri și câini, folosind următoarele metode:

- dozarea proteinemiei prin refractometrie;
- dozarea glucoproteinemiei prin metoda proprie;
- dozarea hexozelor totale legate de proteine (Björnesjö);
- dozarea hexozaminelor totale (Elson-Morgan);
- dozarea seromucoidului (Winzler);
- dozarea acidului neuraminic din singe (Ayala);
- determinarea unei polarografice a serului deproteinizat (Brdička);
- electroforeza liberă a proteinelor (Tiselius);
- electroforeza pe hirtie a proteinelor și a glucoproteinelor din plasmă (Grassmann, Hannig).

Cu privire la experimentarea unei metode corespunzătoare pentru provocarea disproteinemiei la animalele de experiență, s-a constatat că dezavantajul comun al majorității metodelor folosite până în prezent pentru acest scop este că ele produc în primul rând un proces local, la care întregul organism reacționează conform capacității individuale. Fenomenele apărute depind deci de calitatea și întinderea procesului local, respectiv de măsura reacției generale secundare. Acidul silic coloidal 0,5 g%, administrat intravenos sau intraperitoneal la animale de experiență în doze de 10 mg/kg corp, s-a dovedit a fi un mijloc ideal pentru provocarea unei disproteinemii experimentale. Deși acidul silic amestecat cu ser provoacă în concentrații mari și in vitro unele fenomene de denaturare ale proteinelor plasmatice, modificările spectrului proteinic și glucoproteinic ce apar în

cursul administrării lui, nu sînt produse direct de substanța activă în momentul administrării, ci constituie o acțiune generală reală, exercitată asupra elementelor tisulare active din organismul animal. La animalele de experiență în urma administrării parenterale a acidului silicic coloidal se instalează o disproteinemie caracteristică constelației de inflamație acută a lui *Wuhrmann* și *Wunderly*: creșterea proteinemiei, hipoalbuminemie, hiper-alfa-globulinemie și modificări mai puțin accentuate din partea gamaglobulinelor. Modificările glucoproteinelor au fost de același sens, dar mult mai pronunțate. Filtratul serului deproteinizat al animalelor cu disproteinemie silico-toxică a prezentat de asemenea o undă polarografică mult mai ridicată (48,6 mm față de 28,23 mm la iepuri, resp. 61,12 mm față de 43,12 mm la șobolani) în comparație cu cea a animalelor de control.

Modificările de mai sus persistă și după o săptămână de la încetarea administrării siliciului. Însă la 6 săptămîni după terminarea administrării, apar tendințe de normalizare a proteino-, resp. a glucidogramelor și polarigramelor.

La o serie următoare de cercetări efectuate pe diferite animale (șobolani albi, cobai, iepuri și ciini) s-au urmărit și s-au confruntat modificările proteinelor și ale glucoproteinelor în diferitele faze ale evoluției disproteinemilor experimentale, provocate prin administrare de acid silicic coloidal, de vaccin BCG cu bacili vii și omorîți, de extracte de helminți, de suspensie de creier heterolog, precum și de substanțe cu acțiune locală (ulei de terebentină, formalină).

S-a constatat că dintre semnele umorale ale inflamației acute, modificările glucoproteinelor apar mai precoce și sînt mai accentuate decît cele ale proteinemiei, resp. ale fracțiunilor proteice „simple”. În faza acută a inflamației glucoproteinemia crește într-o măsură mai mare, fiind însoțită de o scădere accentuată a glucoproteinelor albuminice, resp. de o creștere pronunțată a fracțiunii glucoproteice alfa-2 (fig. nr. 2 și 3).

Modificările de mai sus persistă și la 6 săptămîni după terminarea administrării factorului patogen. Fenomenele primare ale reacțiilor fazice nespecifice acute apar probabil în primul rînd la nivelul mucosubstanțelor tisulare care furnizează prin descompunerea lor componentele glucidice ale fracțiunilor glucoproteice din plasmă. Acest fapt explică apariția primară a modificărilor glucoproteinelor. Proteinele „simple” le urmăresc pe acestea pe de o parte după o perioadă de latență relativ mai lungă, iar pe de altă parte apar ca factori limitanți în reglarea modificărilor glucoproteinelor în funcție de capacitatea lor de transport.

Cu privire la mecanismele de reglare ale glucoproteinemiei, s-a studiat rolul unor medicamente antiinflamatoare și antibiotice (Streptomicina, PAS, HIN, Tebezolul), influența sistemului hipofizo-corticosuprarenal, iar în sfîrșit, prin cercetarea comparativă a glucoproteinelor din singele periferic, hepatic, portal, lienal, precum și din limfă, s-au tras concluzii și cu privire la locul de formare al glucoproteinelor plasmatiche, resp. la rolul probabil al unor organe și țesuturi în această funcție, făcîndu-se următoarele constatări:

streptomicina și HIN reduc gradul disproteinemiei și al disglucoproteinemiei, indiferent de metoda folosită pentru provocarea acestora. PAS și Tebezolul însă au fost active numai la animalele disproteinemizate prin administrare de vaccin BCG cu bacili vii și omorîți. În cazul disproteinemiei provocate prin ulei de terebentină injectat intramuscular, ele au fost ineficace, cauzînd o oarecare agravare a disproteinemiei (fig. nr. 4 și 5).

Extirparea glandelor suprarenale la șobolani (feriți de „stress-urii”) este urmată numai de o disproteinemie și de o disglucoproteinemie moderată (fig. nr. 6). În schimb, după o disproteinemizare ulterioară (prin administrare de ulei de terebentină, formalină, acid silicic coloidal), modificările umorale devin mult mai grave, tabloul fiind predominant de devierile glucoproteinelor (fig. nr. 6).

Provocarea unei hiperfuncții corticosuprarenale (printr-un efort fizic de durată, resp. prin administrare de ACTH) a redus considerabil gradul disproteinemiei și mai ales al disglucoproteinemiei (fig. nr. 7). Același efect s-a obținut și prin administrare de cortizon (fig. nr. 8).

J. MÓDY: CONTRIBUȚII LA STUDIUL EXPERIMENTAL AL GLUCOPROTEINELOR
DIN PLASMĂ

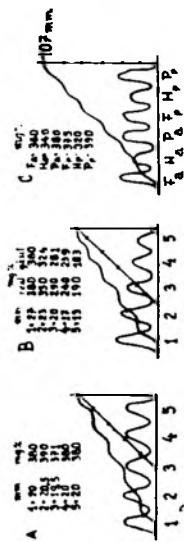


Fig. nr. 1.: Diagrame de glucoproteinemie totală (metoda pro
prio). A — aceeași probă aplicată de 5 ori, B — același ser diluat
succesiv, C — diagramă cu seruri diferite.

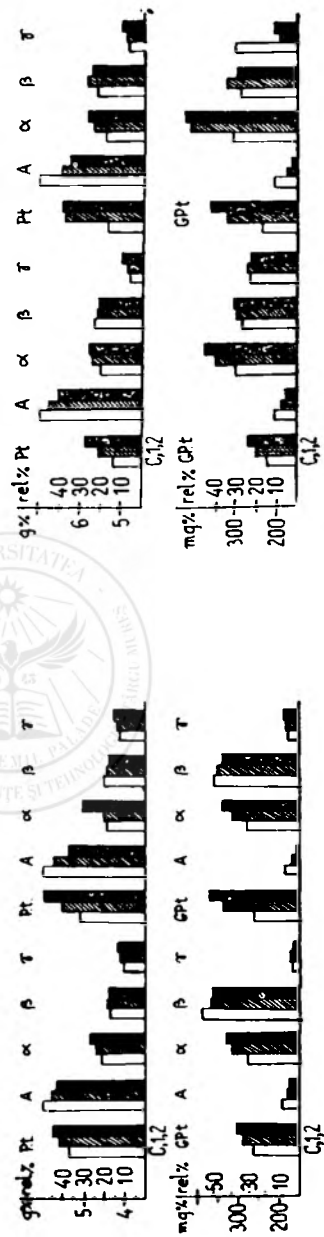


Fig. nr. 2.

Fig. nr. 3.

Fig. nr. 2 și 3.: Proteine (P) și glucoproteine (GP) de șoholan (nr. 2) resp. cobai (nr. 3) tratați cu vaccin BCG cu bacili omorîți
(partea stîngă), resp. vii (partea dreaptă). C = martori, 1 și 2 săptămîni după încetarea administrării.

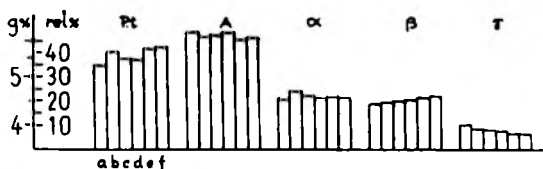


Fig. nr. 4.

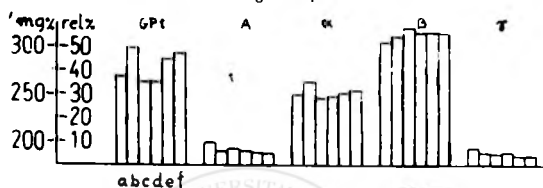


Fig. nr. 5.

Fig. nr. 4 și 5.: Proteine (4) și glucoproteine (5) de șobolani dis-proteinemizați cu ulei de terebentină (sus), resp. cu vaccin BCG cu bacili omorâți (jos) și tratați cu tuberculostatice: a=martori, b=ulei de terebentină, resp. BCG, c= plus streptomicină, d=plus HIN, e= plus PAS, f=plus tebezon.

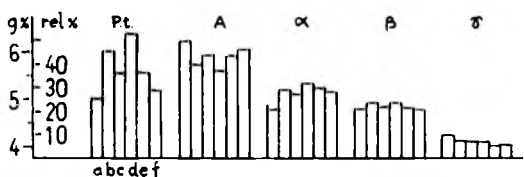


Fig. nr. 6: Proteine (sus) și glucoproteine (jos) de șobolani dis-proteinemizați cu ac. silicic și aduși într-o stare de hiperfuncție corticosuprarenală, resp. tratați cu cortizon, a=martori, b=ac. silicic, c=plus inot, d= plus formalină, e=plus ACTH, f plus cortizon.

1. MÓDY: CONTRIBUTII LA STUDIUL EXPERIMENTAL AL GLUCOPROTEINELOR DIN PLASMĂ

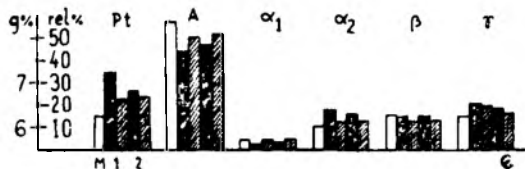


Fig. nr. 7.: Proteine (sus) și glucoproteine (jos) de iepuri disproteinemizați cu ac. silicic coloidal (coloane negre) și tratați cu cortizon (coloane liniate) la 1 și 2 săptămâni după terminarea administrării, față de martori (M).

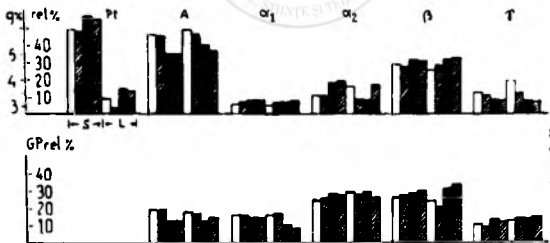


Fig. nr. 9.: Proteine (sus) și glucoproteine (jos) din serul (a) și limfa (l) ciinilor sănătoși (coloane albe), resp. disproteinemizați (coloane negre) cu ac. silicic coloidal, înainte și la 30 min. după administrare de histamină (coloane liniate).

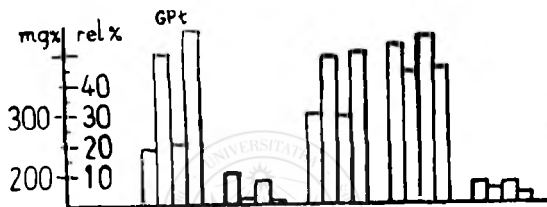
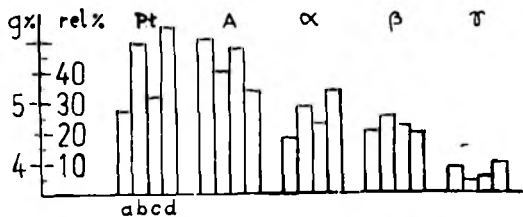


Fig. nr. 8.: Proteine (sus) și glucoproteine (jos) de șoholani mar-tori (a), disproteinemizați cu ac. silicic coloidal (b), suprarenalectomizați (c) în plus și disproteinemizați (d).

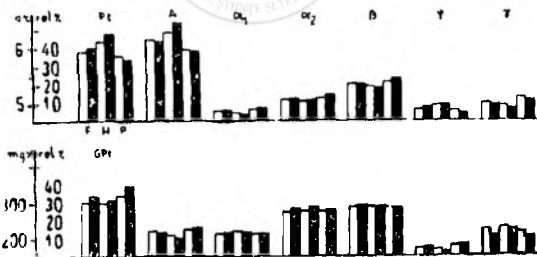


Fig. nr. 10.: Proteine (sus) și glucoproteine (jos) din singele peri-feric (F), hepatic (H) și portal (P) ale ciunilor sănătoși, înainte (coloane albe) și după administrarea i. v. de adrenalină (coloane negre).

Pe baza rezultatelor experiențelor arătate este probabil că glucoproteinele plasmatice (mai corect: partea lor glucidică) provin din descompunerea substanței fundamentale tisulare, printr-un proces care stă pe lângă unii factori exogeni (vitamine, resp. în condiții patologice și de natură microbială, sau toxică) în mare parte sub controlul activității corticosuprarenalelor, fiind influențat în ambele sensuri din partea gluco-, resp. a mineralocorticoizilor.

Experiențele cu privire la studiul rolului splinei în formarea glucoproteinelor serice au fost efectuate pe 15 ciini de ambele sexe. Pentru provocarea disproteinemiei, animalele au primit iv. în decurs de 30 zile în total cantitatea de 0,9—1,7 g acid silicic coloidal (sol. 0,5 g%). S-au studiat comparativ proteinele și glucoproteinele din sângele splenic și periferic.

La animalele sănătoase nu s-au observat decât diferențe neînsemnate între proteinogramele serului circulant și ale celui de rezervă. Proteinemia a fost mai ridicată la toate animalele în depozitul splenic, însă diferențele nu sînt semnificative. S-a observat aceeași situație și la animalele disproteinemizate prin acid silicic coloidal. Frațiunile electrofretice ale glucoproteinelor din depozitul splenic au prezentat însă deosebiri față de cele găsite în sângele circulant. Astfel în sângele splenic conținutul în glucide neutre al albuminelor a fost mai mare, iar cel al fracțiunilor alfa-1 și gama a fost mai redus. Acest fapt ar pleda pentru existența unui echilibru dinamic pe de o parte între proteinele din plasmă și țesuturi, iar pe de altă parte între substanțele glucidice legate de proteinele plasmatice și tisulare. Factorul limitant ar fi în primul caz proteinemia însăși (limitarea creșterii proteinemiei peste valorile normale), iar în cel din urmă capacitatea de transport (de a lega alte substanțe) a fracțiunilor proteice; (prin stagnarea în splină albuminele au posibilitatea chiar și să se „suprasaturizeze” cu glucide).

Cercetarea locului de formare al glucoproteinelor plasmatice a fost realizată prin studiul comparativ al proteinelor și glucoproteinelor din plasma obținută din sângele hepatic, hepatic, portal, precum și din limfa a două loturi de ciini, cuprinzînd 24, resp. 40 de animale. În cadrul primei serii de cercetări s-a comparat raportul proteinelor și glucoproteinelor din limfa și sângele periferic la 14 animale sănătoase resp. la 10 disproteinemizate printr-o administrare cronică de acid silicic coloidal. S-a constatat că concentrația proteinelor totale în limfă a fost mai mică atît la animalele martore, cît și la cele disproteinemizate. Valoarea relativă a albuminelor în limfă a fost la majoritatea animalelor mai mare (21 din 24), în unele cazuri a apărut și o fracțiune prealbuminică, iar alfa-globulinele au fost mai scăzute.

Cu privire la comportarea glucoproteinelor s-a constatat că unele fracțiuni glucoproteice ale serului și ale limfei s-au comportat în mod diferit la cele două grupe de animale: la majoritatea animalelor de control glucoproteinele beta s-au găsit într-o concentrație mai mică în limfă, iar la cele tratate cu acid silicic, într-o concentrație mai mare. În cazul glucoproteinelor gama situația a fost tocmai inversă.

Provocînd o creștere a fluxului limfatic prin administrare de histamină, cantitatea proteinelor totale a scăzut la fiecare animal de control, în schimb la cele disproteinemizate ea s-a modificat în ambele sensuri. Procentul relativ al albuminelor a scăzut la majoritatea animalelor din ambele grupe, iar fracțiunile alfa în general s-au înmulțit.

Comportarea glucoproteinelor a fost diferită la cele două grupe de animale. Astfel, sub acțiunea histaminei conținutul în glucide neutre al albuminelor s-a înmulțit în limfa animalelor disproteinemizate și a rămas neschimbat, resp. a scăzut la cele de control. Procentul relativ al glucoproteinelor alfa-1 și alfa-2 a crescut la toate animalele de control, în același timp însă a scăzut la majoritatea animalelor disproteinemizate. În general variațiile au fost mai mari la ciinii tratați cu acid silicic, decît la cei de control (fig. nr. 8).

Diferențele amintite, dintre fracțiunile limfatice de glucoproteine ale animalelor sănătoase, resp. disproteinemizate, pot fi interpretate tot prin prisma capaci-

tăți) de transport a proteinelor: conținutul redus în glucide al beta-globulinelor limfatice poate fi înțeles prin conținutul ridicat în lipide al fracțiunii; „suprasaturarea” suprafeței vehiculante a betaglobulinelor cauzează reducerea capacității lor de a lega și glucide. În cazul gama-globulinelor apare fenomenul invers: conținutul în glucide neutre al gamaglobulinelor este mai mare în limfă, probabil pentru faptul că aceste globuline nu iau parte de loc în transportul lipidelor. Suprafața lor poate fi folosită deci chiar și într-o măsură exagerată pentru transportul glucidelor legate de proteine. Fiind vorba de o competiție dependentă de concentrații, în cazul predominanței glucidelor (procese patologice tisulare, depolimerizarea substanței fundamentale) pot apare și raporturi inverse, ca în cazul limfei animalelor tratate cu acid silicic.

În seria a doua a cercetărilor s-au studiat comparativ proteinele și gluco-proteinele plasmaticе din singele periferic, portal și hepatic la 40 de cini, prezentînd modificări însemnate atît între conținutul proteic cît și cel gluco-proteic al plasmelor de proveniență diferită. În majoritatea cazurilor proteinemia a fost mai ridicată în singele venei hepatice, fiind cea mai scăzută în singele portal. Gluco-proteinemia însă a prezentat o comportare tocmai inversă. Frațiunile albuminice și de fibrinogen predomină în singele hepatic, avînd valorile cele mai scăzute în singele portal. Și în cazul acestor fracțiuni s-a observat o comportare inversă a fracțiunilor gluco-proteice corespunzătoare, conținutul în glucide al albuminelor și fibrinogenului fiind cel mai ridicat în plasma provenită din singele portal (fig. nr. 10).

Referitor la comportarea acidului neuraminic și a seromucoidului, la fel s-au obținut rezultate concludente. Aceste două substanțe au fost găsite în concentrațiile cele mai mari în singele portal, prezentînd valorile cele mai scăzute în singele venei hepatice. Diferențele au devenit și mai accentuate în urma unei administrări iv. de adrenalină. Cantitatea hexozelor totale neglucozaminice legate de proteine a prezentat devieri în ambele sensuri, dar în majoritatea cazurilor valorile cele mai ridicate au fost găsite în singele hepatic, crescînd și mai departe în urma acțiunii adrenalinei. Foarte probabil că este vorba în acest caz de acțiunea hiperglicemizantă a adrenalinei.

Prin experiențele de mai sus au putut fi confirmate ipotezele privitoare la locul de formare al fracțiunilor proteice de albumină și de fibrinogen în ficat. Globulinele se formează însă și în alte țesuturi și organe, inclusiv teritoriul splanchnic, cauzînd creșterea cantităților lor în singele portal. După o excitație umorală acută (administrare iv. de adrenalină) are loc imediat pornirea reacției de „fază acută”, ce se manifestă umoral sub forma unei descreșteri a albuminelor, a gama-globulinelor, resp. sub forma unei hiper-, alfa- și betaglobulinemii destul de marcate. Cantitatea de fibrinogen crește în singele periferic în primul rînd în urma unei eliberări mai intense din ficat. În asemenea condiții cresc și albuminele în singele venei hepatice, înșă acest fenomen nu apare în singele periferic, fiind acoperit de creșterea globulinelor.

Totodată s-a constatat comportarea mult mai interesantă a gluco-proteinelor, cele fiind mai scăzute în singele hepatic și mult mai ridicate în cel portal. Atît seromucoidul, cît și acidul neuraminic au prezentat aceleași condiții cantitative.

Pe baza acestor observații putem presupune că formarea gluco-proteinelor pare să cuprîndă două procese într-o oarecare măsură separate unul de altul: fenomenul primar îl constituie formarea fracțiunilor proteice „simple”, cu componentele lor structurale glucidice permanente, fixate prin legături stabile, covalente. Aceste fracțiuni, intrînd în torentul circulator, mai leagă unele substanțe glucidice la nivelul altor organe și țesuturi, pe măsura capacității lor de transport, în sensul noțiunii folosite de *Bennhold*

Factorul limitant, ce intervine în prima instanță în reglarea gluco-proteinemiei, îl constituie probabil capacitatea fracțiunilor proteice de a fixa componentele glucidice mai labile.

Rolul ficatului în producerea glucoproteinelor plasmatice pare să fie redus. Scăderea glucoproteinemiei în urma unor leziuni ale parenchimului hepatic pare să fie cauzată mai mult printr-un mecanism indirect: printr-o inactivare insuficientă a hormonilor cu acțiune asupra sistemului mezenchimal. Acest fapt duce la creșterea activității lor la periferie, deci la reducerea proceselor de degradare ale substanței fundamentale și în consecință la descreșterea conținutului în glucoză al fracțiunilor proteice din plasmă.*

Sosit la redacție: 21 martie 1966.

Bibliografia la autor.

* Mulțumesc pe această cale tov. conf. Szabó de la I.M.F. Tg.-Mureș și prof. M. Vanghelovici de la Institutul de medicină Timișoara pentru prețioasa lor colaborare și îndrumare.

