

CERULOPLASMINA ÎN LICHIDUL CEFALO-RAHIDIAN

Iazigian Ana, Palade Cornelia

Ceruloplasmina este o enzimă cu proprietăți oxidazice evidențiată în ser și caracterizată din punct de vedere biochimic prima dată de *Holmberg* și *Laurell* (13—15). Molecula sa este un complex al unei alfa₂-globuline cu o cantitate însemnată de glucide (hexoze, hexozamine, acid neuraminic) și cupru. Ea reprezintă aproximativ 0,5% din proteinele serice și leagă peste 90% din cuprul circulant. Datorită prezenței cuprului, enzima are culoare albastră și prezintă un maxim de absorbție la 610 m μ (4).

S-au efectuat numeroase cercetări în scopul stabilirii rolului fiziologic al ceruloplasminei. Capacitatea enzimei de a cataliza in vitro oxidarea histaminei, adrenalinei, noradrenalinei, serotoninei, acidului ascorbic, glutatoinului etc. servește ca bază pentru unele ipoteze privind funcția sa în organism. Cu tot numărul mare de lucrări însă, nu s-a stabilit nici până în prezent care este adevăratul substrat și modul de acțiune al ceruloplasminei in vivo. În orice caz, se admite că acționează, cel puțin într-o oarecare măsură, tot ca oxidază.

S-a constatat modificarea concentrației ceruloplasminei serice în diferite stări patologice, până în prezent însă, boala lui Wilson (degenerescenta hepato-lenticulară) este singura afecțiune în care determinarea concentrației ceruloplasminei serice are valoare în precizarea diagnosticului.

Cunoscând faptul că sistemul nervos central este deosebit de sensibil la tulburările metabolismului cuprului, în ultima vreme s-au făcut încercări pentru evidențierea și apoi determinarea concentrației și rolului ceruloplasminei și în lichidul cefalorahidian (LCR). În ce privește prezența ceruloplasminei în LCR, multă vreme părerile au fost contradictorii, unii autori contestând chiar prezența sa în această umoare. Astfel făcând analiza imunoelectroforetică a lichidului cefalorahidian *Gavrilescu* și colab. (11), ca și *Burtin* (3—6) n-au putut confirma prezența ceruloplasminei.

În anul 1957, *Vella* (22) a arătat că LCR oxidează parafenilen diamina (PPD) în condiții de incubare corespunzătoare. Prin studii electroforetice au dovedit ca această activitate aparține ceruloplasminei. Tot prin electroforeză au arătat prezența ceruloplasminei în LCR, *Dencker* și *Swahn* (10) apoi *Laterre* și colab. (17).

Clausen (7—9) a identificat ceruloplasmina în LCR concentrat de 50 ori, arătând că deși proprietățile imunologice ale ceruloplasminei din LCR sînt identice cu ale celei din ser, proprietățile oxidazice diferă. *Goodman* și *Vulpe* (12) folosind metoda imunochimică pentru determinarea cantitativă a diferitelor fracțiuni proteice din LCR, au raportat că concentrația medie de ceruloplasmină în LCR normal este de 130 μ g%. În 1963 *Jensen* (16), folosind ca substrat PPD, dimetil-PPD și ortodanisidina a arătat, prin electroforeză în gel de agar, prezența în mod constant a ceruloplasminei în LCR studiat. Autorul a mai arătat și identitatea proprietăților oxidazice și electroforetice ale ceruloplasminei din LCR cu cea din ser. N-a reușit însă să determine cantitativ ceruloplasmina din LCR.

Bammer (1) printr-o metodă spectrofotometrică pusă la punct de *Baloff* (2) prin modificarea metodei lui *Ravin* (20) a făcut determinări cantitative de ceruloplasmină în LCR, găsind în cazuri normale valori cuprinse între 20—160 $\mu\text{g}\%$, în funcție de proteinorahie.

În lucrarea de față ne-am propus să adaptăm metoda lui *Ravin*, pentru determinarea ceruloplasminei în LCR și să studiem concentrația normală a ceruloplasminei în LCR uman. În același timp am urmărit corelația dintre ceruloplasmina serică, ceruloplasmina lichidiană și proteinorahie.

Material și metodă

Determinările le-am executat pe un număr de 30 pacienți ai Clinicii de neurologie și Clinicii de oftalmologie. Persoanele studiate nu au suferit de afecțiuni neurologice organice și au prezentat o proteinorahie normală.

Determinarea proteinorahiei: am aplicat metoda lui *Lowry* și colab (19) considerând normale valorile cuprinse între 16—50 $\text{mg}\%$.

Determinarea ceruloplasminei serice: am utilizat metoda lui *Ravin* (20), considerând normale valorile cuprinse între limitele stabilite de acest autor ($32,3 \pm 4,9 \text{ mg}\%$) și verificate de noi la 30 persoane sănătoase.

Determinarea ceruloplasminei în LCR. Am adaptat metoda lui *Ravin* (20) după ce printr-o serie de experiențe preliminare (15 cazuri) ne-am convins că LCR manifestă în mod constant proprietăți oxidazice față de PPD. Pentru aplicarea acestei metode la LCR, a fost necesară stabilirea unor condiții optime corespunzătoare concentrației scăzute de ceruloplasmină în comparație cu ceruloplasmina serică. Procedeu aplicat de noi se execută în următoarele etape:

a) *Concentrarea lichidului cefalo-rahidian.* Aproximativ 10—15 ml LCR a cărui concentrație de proteine s-a determinat prin metoda citată, s-au concentrat cu ajutorul unui săculeț de celofan. În tot cursul concentrării care a durat aproximativ 15—20 ore, probele au fost păstrate la frigider. Cantitatea foarte mică de lichid rămas în săculeț, s-a reluat cu aproximativ 3 ml tampon acetat 0,4 molar pH 5,5 și s-a trecut într-o eprubetă. S-a determinat, ca mai înainte, conținutul proteic al acestei soluții pentru a stabili gradul de concentrare al LCR.

b) *Determinarea ceruloplasminei:* într-o eprubetă s-a pregătit proba cu 1 ml LCR concentrat și reluat cu tampon, 7 ml tampon și 1 ml PPD 0,5 $\text{g}\%$; în alta, s-a adăugat și la probă 1 ml azidă de sodiu și eprubetele s-au lăsat 30 minute la azidă de sodiu 0,5 $\text{g}\%$. Ambele eprubete s-au lăsat 4 ore la 37° C. După aceasta s-a adăugat și la probă 1 ml azidă de sodiu și eprubetele s-au lăsat 30 minute la 4 C. S-a citit apoi extincția probei față de martor la 530 milimicroni folosind cuva de 1 cm.

c) *Calcularea rezultatelor.* S-a folosit o curbă de calibrare obținută în felul următor: s-a determinat concentrația de ceruloplasmina a unui ser normal (sau amestec de seruri normale) prin metoda lui *Ravin* (20). Serul a fost apoi diluat cu tampon acetat realizând diluții cuprinse între 1/75 și 1/300. S-a făcut incubarea pentru fiecare diluție în parte în modul arătat la LCR, iar rezultatele s-au reprezentat grafic.

Pentru evaluarea rezultatelor am folosit fie curba astfel obținută, fie factorul de pantă al acestei curbe.

Extincția a crescut proporțional cu concentrația, astfel încât curba a avut un aspect liniar. Între extincție și timpul de incubare al probei s-a găsit o relație de același tip.

Valoarea citită din curbă s-a împărțit cu raportul dintre concentrația de proteine din LCR concentrat și reluat cu tampon și concentrația inițială de proteine a LCR.

Calculul s-a făcut pentru o parte din determinări și cu ajutorul constantei lui Ravin, ținându-se cont de gradul de concentrare al LCR, dat de concentrarea lichidului în sine, mărirea cantității de material luat în lucru (10 ori) și a timpului de incubare (4 ori).

Calcululele statistico-matematice: determinarea erorii standard, calcularea erorii medii a mediei, calcularea coeficientului de corelație.

Rezultate

Concentrațiile de ceruloplasmină în LCR obținute la 30 indivizi normali se distribuie între 160 $\mu\text{g } \%$ valoarea maximă și 27 $\mu\text{g } \%$ valoarea minimă, cu o medie aritmetică de 101,16 $\mu\text{g } \%$ ceruloplasmina, deviația standard de $\pm 33,1$ și eroarea medie a mediei de $\pm 6,13$. Această valoare reprezintă în medie 0,309% din conținutul total de proteine al LCR.

Confruntind rezultatele obținute prin cele două procedee de calcul, am constatat că valorile de ceruloplasmină din LCR, obținute cu ajutorul constantei lui Ravin sînt foarte apropiate de cele stabilite cu ajutorul curbei de calibrare construite. Spre exemplificare în tabelul nr. 1 redăm cîteva date paralele:

Tabelul nr. 1.

Concentrația de ceruloplasmină din LCR în $\mu\text{g } \%$

Nr. crt.	Curba de calibrare	Constanta lui Ravin
1.	105.6	105,2
2.	54.3	55.0
3.	122.0	128.0
4.	96.0	97.0
5.	130.0	124.0
6.	88.0	82.0
7.	123.0	123.8
8.	80.0	75.0
9.	118.0	118.7

Examinînd relația dintre ceruloplasmina lichidiană și proteinorahie am observat că ele variază paralel. Coeficientul de corelație $r = +0,52$, $t = 3,3$, $P < 0,01$. ceea ce corespunde unei corelații pozitive semnificative. Făcînd același calcul pentru ceruloplasmina din LCR și ceruloplasmina din ser. am obținut o corelație slabă, $r = 0,3$, $t = 1,51$. $0,1 < P < 0,2$.

Discuții

În alegerea condițiilor de lucru s-a pornit de la cercetările lui Ravin (20) care a constatat că concentrația de ceruloplasmină, respectiv timpul de incubare la aceleași concentrații și intensitatea reacției de culoare este o relație de proporționalitate directă (20). Aceste relații au fost verificate de noi și pentru LCR.

În condițiile arătate la partea experimentală, folosind un concentrat de LCR tamponat, puterea ionică a probelor cu LCR a fost practic aceeași cu a probelor cu ser, activitatea enzimei neavind de suferit din această cauză.

Compararea rezultatelor cu un standard cu concentrația de ceruloplasmină apropiată de a probelor cu LCR, tratat la fel ca și LCR-ul concentrat, a fost o garanție în plus pentru corectitudinea determinărilor. Aceasta o dovedește și faptul că folosind în calcule fie curba de calibrare construită de noi în condițiile experimentale date, fie constanta lui Ravin, am obținut rezultate foarte apropiate.

Astfel concentrând LCR-ul de numai aproximativ 3 ori, dar crescând de 10 ori cantitatea de material luat în lucru și de 4 ori timpul de incubare față de ser, am reușit să determinăm cantitatea de ceruloplasmină din LCR.

Este fapt dovedit că majoritatea fracțiunilor proteice din LCR provin din plasma sanguină, prin traversarea pasivă a barierei hemato-lichidiene. Proteinele apar în LCR direct proporțional cu concentrația lor plasmatică și invers proporțional cu greutatea moleculară (*Rosenthal și Soothill*, 21). Astfel fracțiunea Ig G care are o greutate moleculară între 156 000—161 000, iar raportul concentrației sale din LCR și din plasmă variază între 1:600—1:1000. În cazul ceruloplasminei cu o greutate moleculară aproape identică (160 000), acest raport LCR/plasmă este între 1:270—1:630.

Concentrația ceruloplasminei în LCR este deci superioară valorii corespunzătoare condițiilor de mai sus, ceea ce argumentează pentru o sinteză locală la nivelul sistemului nervos central. Pentru această independență relativă a ceruloplasminei lichidiene pledează și lipsa unei corelații cantitative evidente între ea și ceruloplasmina serică.

Sosit la redacție: 6 decembrie 1968.

Bibliografie

1. BAMMER H.: Deutsche Zeitschrift für Nervenheilkunde (1966). 189. 312;
2. BALLOF D.: Bestimmung des Coeruloplasmin mit einer photometrischen Methode in Blut und Liquor unter besonderer Berücksichtigung des Coeruloplasminspiegels bei der hepatocerebralen Degeneration und der Multiplen Sklerose, Inaugural Dissertation, Würzburg, 1965;
3. BURTIN P.: in PEETERS H.: Protides of biological fluids, Elsevier Publ. Co. Amsterdam, 1959. 212;
4. BURTIN P.: Clin. Chim. Acta (1959). 4. 72;
5. BURTIN P.: in GRABAR P., BURTIN P.: Analyse Immunoelectrophoretique Paris 1960;
6. BURTIN P.: in GRABAR P., BURTIN P.: Immunelectrophoretic analyse 1964. cap. 21. p. 244;
7. CLAUSEN J.: Acta Psychiatr. Neurol. Scand. (1960). 35. suppl. 148. 11;
8. CLAUSEN J.: World Neurology (1960). 1. 6. 479;
9. CLAUSEN J.: Dan. Med. Bull. (1962). 9. 1;
10. DENCKER S. J., SWAHN B.: Fysiograf Sällskap Handlingar (NF) Lund Sweden 1961. 72. suppl. 10;
11. GAVRILESCO K., COURCON J., HILLION P., URIEL J., LEVIN J., GRABAR P.: Bul. Soc. Chim. biol. (1955). 73. 803;
12. GOODMAN M., VULPE M.: World Neurology (1961). 2/7. 589;
13. HOLMBERG C. G., LAURELL C. B.: Acta Chem. Scand. (1948). 2. 550;
14. HOLMBERG C. G., LAURELL C. B.: Acta Chem. Scand. (1951). 5. 476;
15. HOLMBERG C. G., LAURELL C. B.: Scand. J. Clin. Lab. Invest. (1951). 3. 103;
16. JENSEN K.: Acta Neurol. Scand. (1963). 39/3. 237;
17. LETERRE E. C., HEREMANS J. F., DEMANET G.: Rev. Neurol. (1962). 107. 500;
18. LAURELL C. B.: The Plasma Proteine Ed. Frank. W. Putman, Acad. Presse New York — London, 1960;
19. LOWRY H. O., ROSEBROUGH N. J., FARR A. L., RANDALL R. J.: J. Biol. Chem. (1951). 193. 265;
20. RAVIN H. A.: J. Lab. a Clin. Med. (1961). 58. 161;
21. ROSENTHAL F. D., SOOTHILL J. F.: J. Neurol. Neurosurg. Psychiat. (1962). 25. 177;
22. VELLA F.: Med. J. Malaya (1957). 12. 456