

Catedra de chimie generală și de biochimie (Cond.: Conf. dr. Kovács Endre)

**STUDIUL ELECTROFORETIC AL STABILITĂȚII PROTEINELOR
SERULUI SANGUIN FAȚA DE SULFOCIANURA DE AMONIU
ÎN DIFERITE MALADII**

Kovács E. Módy J., Kerekes M.

Importanța biologică covârșitoare a proteinelor explică faptul că studiul proprietăților lor fizico-chimice și biologice a devenit o preocupare principală a cercetătorilor. Rezultatele acestor cercetări sînt importante atît

în domeniul biochimiei, cât și în cel al chimiei. În prezent, dispunem de numeroase date nu numai despre structura chimică, proprietățile, biosinteza proteinelor, dar și despre patologia metabolismului lor, iar studiul variațiilor proteinogramei sanguine în cursul diferitelor maladii a dat un ajutor prețios clinicianului. Acest fapt justifică numărul foarte ridicat al probelor de laborator consacrate protidelor singelui: *Heepe* (3) citează 250 de diferite metode în acest domeniu. Toate acestea au un inconvenient comun: ele nu sînt specifice și reflecta variația numai a unora dintre proteine (9). Metodele cele mai moderne, cum sînt ultracentrifugarea, electroforeza și polarografia au în fond aceleași neajunsuri: ele studiază numai unele aspecte ale problemei foarte complexe despre structura proteinelor. De aceea, *Pospissil* are deplină dreptate (9), cînd accentuează că toate concluziile de ordin fizico-chimic ale cercetării proteinelor trebuie aplicate cu mari rezerve la complexul organismului viu. Este ușor de înțeles că în ciuda numeroaselor metode de cercetare și date experimentale, cunoștințele noastre asupra structurii proteinelor și metabolismului lor, îndeosebi în condiții patologice se pot considera foarte lacunare. Rezolvarea problemei este cu alit mai grea cu cît proteinele native sînt substanțe foarte instabile care, pe lângă acestea intră în cele mai variate legături cu alte substanțe de natură proteică și neproteică (10). Trebuie să luăm în considerare acest fenomen mai ales la studiul proteinelor din serul sanguin. Și în cazul acestora avem de-a face cu un sistem foarte complex; totuși majoritatea metodelor de laborator se referă la studiul lor, deoarece orice alt material biologic reprezintă sisteme și mai complicate care sînt și mai puțin apte pentru metodele noastre actuale de cercetare.

Pe baza experienței de pînă acum, putem afirma că metodele fizico-chimice de cercetare a proteinelor nu au dat pentru clinician rezultatul dorit, deoarece ele oglindesc numai variațiuni nespecifice ale fracțiunilor protidice (12). Reacțiile coloido-chimice pun în evidență modificările cantitative ale unora din fracțiuni în timp ce paraproteinele pot fi detectate cu ajutorul lor doar în cazul cînd ele apar în cantități mai mari (ex.: mielom multiplu, amiloidoză, unele forme de leziuni hepatice (2)). Putem presupune însă că în cazul multor maladii apar în sînge proteine cu structură modificată în cantități mai mici sau mai mari, dar prezența lor nu se poate pune în evidență cu metodele care ne stau la dispoziție.

Pe baza datelor cunoscute referitoare la procesul de denaturare prin agenți fizici sau chimici a proteidelor, precum și în virtutea teoriilor moderne asupra sintezei lor (*Pauling, Haurowitz*, și a.) este de așteptat ca unele procese patologice să aducă modificări structurale, fie prin influențarea directă a mecanismului de sinteză, fie prin schimbarea ulterioară a structurii proteinelor plasmatică odată sintetizate. Aceste modificări nu ating componența aminoacidă a proteinelor, ci se limitează mai mult la variația raporturilor sterice ale catenelor polipeptidice și la legăturile secundare care determină aceste raporturi. De fapt, fracțiunile proteice au aceeași componență aminoacidă în disproteinemii ca și în cazuri normale (1). Această componență variază numai în tulburări grave ale metabolismului proteic (mielom, macroglobulinemia Waldenstroem, leziuni hepatice difuze, amiloidoză, etc. (2, 11)).

Este ușor de înțeles după cele spuse, că se impune din ce în ce mai mult necesitatea de a găsi metode noi care să fie capabile de a pune în

evidență, pe lângă variațiunile cantitative ale fracțiunilor proteice, și modificările survenite în structura acestora. Această necesitate ne-a condus să combinăm metoda electroforetică, bine aplicabilă pentru măsurarea variațiunilor cantitative, cu o metodă care este în legătură cu factorii structurali ai proteinelor. Ni s-a părut că în acest scop, denaturarea proteinelor ar putea fi de folos. Este de așteptat într-adevăr, ca proteinele cu structura modificată de procesul patologic să fie mai sensibile decât cele normale, deci sub acțiunea unor agenți mai puțin energici să apară modificări detectabile (de ex. modificarea mobilității electroforetice (4, 5, 6).

În experiențele noastre anterioare am cercetat efectul căldurii și al soluției de iod (4, 5, 6, 7). În lucrarea de față ne-am propus să studiem influența ionului sulfocian, care la pH alcalin precipita protidele numai în concentrații mari. Modificări structurale fine în molecula proteinelor pot să apară și la concentrații mai mici și măsura lor ar putea fi diferită, în funcție de stabilitatea variabilă a moleculei proteice și astfel ar putea servi și în scopuri diagnostice.

Efectul denaturant al sulfocianurii de amoniu a fost studiat pe materialul alor 50 de cazuri — sănătoși și suferind de diferite maladii — urmărind variația curbei electroforetice.

Metoda. S-a căutat o concentrație de sulfocianură la care serurile normale au arătat o modificare minimă, dar bine determinabilă. În acest scop s-a adăugat la 2 ml ser sanguin o soluție 60%, de sulfocianură de amoniu în cantitate crescândă, apoi amestecul s-a păstrat 24 ore la +2°C în frigider. Pe urmă, serurile astfel tratate au fost supuse dializei în săculețe de colodiu față de tampon Michaelis pH 8,6 timp de 24 ore, și după diluare cu sol. tampon pînă la concentrația de 1% proteine, s-a procedat la electroforeză în celulă electroforetică (8). Diagramele obținute, după măsurarea obișnuită, s-au comparat cu cele ale serurilor netratate.

Din experiențele noastre a reieșit că sub acțiunea sulfocianurii de amoniu, cantitatea albuminelor arată o descreștere moderată, a gamaglobulinelor, însă o micșorare importantă pe lângă creșterea concomitentă a fracțiunilor alfa- și betaglobulinice. Aceste două din urmă, în general, se contopesc și migrează în unele cazuri cu mobilitatea alfa-globulinelor, alteleori cu a betaglobulinelor. În cazul serurilor normale, acest fenomen apare la adăugarea a 0,5 ml. sulfocianură de amoniu 60% la 2 ml ser (concentrație finală 12%). Mărind cantitatea sulfocianurii, descreșterea albuminelor și gamaglobulinelor devine mai accentuată, iar la proporția de 1 ml sulfocianură 60% la 2 ml ser (concentrația finală în sulfocianură 20%), în timpul păstrării nu se produce nici o schimbare macroscopică, dar la dializă față de tampon Michaelis pH 8,6 după 1—2 ore, apare un precipitat abundent, format mai ales din gamaglobuline. Variația diagramei electroforetice sub influența sulfocianurii de amoniu, în cantitate crescândă, este reprezentată în fig. 1.

Considerînd că sulfocianura de amoniu dă efectul dorit în concentrație de 12% (2 ml ser + 0,5 ml $\text{NH}_4 \text{SCN}$ 60%) cercetările asupra serului bol-

navilor s-au efectuat respectînd acest raport. Am studiat în primul rînd, cazuri cu hipergamaglobulinemie, deoarece acțiunea denaturantă a NH_4SCN are repercusiuni mai mult asupra gamaglobulinelor. În aceste cazuri, modificări evidente ale curbei electroforetice apar și în cazul cînd se adaugă la 2 ml ser numai 0,25 ml NH_4SCN 60% (concentrație finală 7,55%).

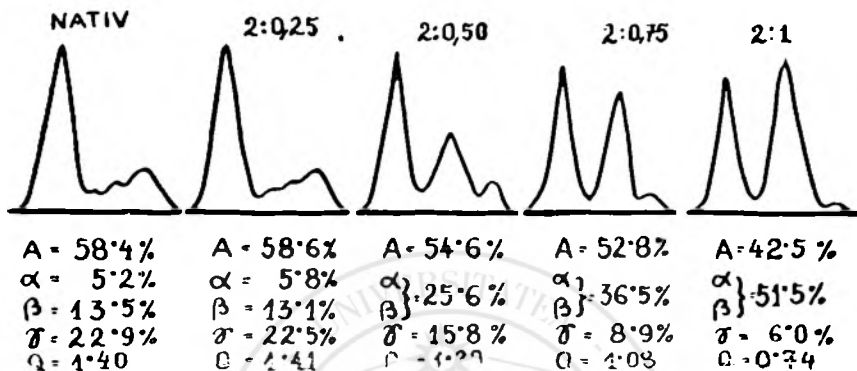


Fig. 1.

(Modificarea diagramei electroforetice a serului sanguin normal sub influența sulfocianurii de amoniu în concentrație crescîndă. Raporturile înscrise deasupra curbelor reprezintă raportul ml. ser/ml sulfocianură de amoniu 60%. Diagrama electroforetică corespunzătoare raportului 2:1 se referă la soluția supernatantă).

Am efectuat în condițiile arătate analiza electroforetică a serului la hepatici (ciroză hepatică, hepatită cronică, abces hepatic), cardiaci (endocardită lentă, cardiomiopatie cronică) precum și în cazuri de stări septice, tumori și nefropatii. Valorile medii ale rezultatelor analitice sînt reprezentate în fig. 2.

Din datele din figură reiese că la indivizi clinic sănătoși, scăderea gamaglobulinelor prezintă valori între 10—15%, în nefrite și tumori 18—22%, în alte cazuri cu hipergamaglobulinemie atinge valori de 30—50%. Este demn de amintit că un singur caz cercetat de diabet zaharat cu hipogamaglobulinemie a manifestat o descreștere de 31% după denaturare cu sulfocianură. Datele experiențelor arată că descreșterea gamaglobulinelor la denaturare cu sulfocianură de amoniu este mai pronunțată în hipergamaglobulinemii de origine hepatică: în ciroze și hepatite cronice mai grave am găsit scăderi de gamaglobulinemie între cifrele 45—55%, pe cînd în endocardită lentă și stări septice, limita superioară în general nu întrece 30%. Acest fapt se datorește desigur tulburării metabolismului proteic în urma leziunilor hepatice. Scăderea nivelului albuminiei oscilează între 0—11%. După denaturare, alfa- și betaglobulinele numai în rare cazuri se pot diferenția la electroforeză, cînd se observă o augmentare izolată, fie a

fracțiunii cu mobilitatea corespunzătoare alfa-globulinelor, fie a beta-globulinelor. În general însă aceste două fracțiuni se contopesc și migrează odată cu viteza alfa-globulinelor, altădată cu a beta-globulinelor. Nu am găsit o regularitate în apariția fenomenului și nu am putut pune în evidență legătura lui cu procesul patologic sau starea clinică a bolnavului.

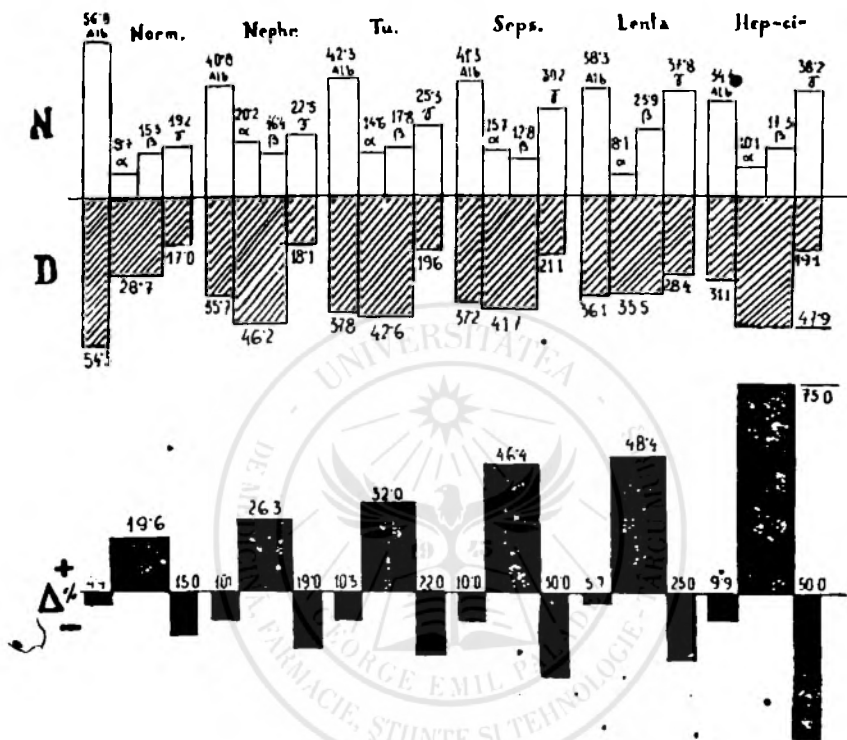


Fig. 2.

(Diagramele reprezintă concentrațiile procentuale relative ale fracțiilor proteice: albmine alfa-, beta-, gamaglobuline. Coloanele însemnate cu N se referă la serurile native, cele cu D la serurile denaturate. Coloanele Δ reprezintă diferențele în %, survenite în cursul denaturării: creștere (-), micșorare (-) a fracțiilor proteice.

Cu toate că cercetările noastre de pînă acum nu pot da un răspuns la problema mecanismului intim al denaturării proteinelor cu sulfocianuri, totuși credem că este demn de amintit că toți agenții denaturanți care au fost studiați de noi în condiții similare (căldura, iodul, sulfocianura) provoacă, fără excepție, scăderea albuminelor și gamaglobulinelor, măbind nivelul fracțiunii cu viteza de migrare egală fie cu a alfa-, fie cu a beta-globulinelor. Avem impresia că valorile potențialului electrocinetic apropiat de cele găsite la alfa și beta-globuline sînt acelea care corespund

cele mai verosimile structuri din punct de vedere termodinamic a suprafeței miclei proteice.

Numărul restrins al cazurilor studiate ne împiedică să ne pronunțăm asupra valorii diagnostice a metodei descrise cu atât mai mult cu cât scopul nostru a fost numai punerea în evidență a diferențelor dintre proteinele normale și cele patologice ce apar în cursul denaturării lor. Confruntarea sistematică a rezultatelor de laborator și a tabloului clinic pe un material mai vast ar putea da un răspuns și la această întrebare.

Rezumat.

Am studiat pe cale electroforetică efectul denaturant al sulfocianurii de amoniu asupra proteinelor pe un material de 50 de cazuri normale și patologice.

Pe lângă o ușoară descreștere a albuminelor, gamaglobulinele prezintă o scădere impresionantă cu augmentarea concomitentă a alfa- și betaglobulinelor. Aceste două fracțiuni în general, se contopesc și migrează când cu viteza alfa-globulinelor, când cu cea a betaglobulinelor. Acest fenomen ia naștere în cazul serului indivizilor sănătoși la adăogarea de 0,5 ml soluție 60% de sulfocianură de amoniu la 2 ml ser (concentrația finală în sulfocianură 12%).

Pe lângă cazuri practic sănătoase am studiat în condițiile amintite seruri provenite de la bolnavi cu leziuni hepatice, cardiace, renale, cu stări septicе, tumorоși, etc.

La indivizi sănătoși, denaturarea provoacă în gamaglobulinemie o scădere de 10—15%, în nefrite, tumori 18—22%, în maladii însoțite de hiper-gamaglobulinemii 30—50%. Scăderea cea mai pronunțată se observă în hipergamaglobulinemii de origine hepatică. Acest fapt se explică prin modificarea metabolismului proteic datorită leziunii hepatice.

Sosită la redacție la 15 iunie 1957.

Bibliografie:

1. *Cummings A. J., Flynn F. C.*: J. Clin. Path. 1955, 8, 153; 2. *Dirr K.*: Kl. Wschr. 1955, 33/34, 818.; 3. *Heepe G.*: Die unspezifischen Bluteiweisreaktionen. (Darmstadt) 1953; 4. *Kovács E., Kerekes M.*: conf. ținută la S.Șt.M. Il. Tg. Mureș la 8 dec. 1953; 5. *Kovács E., Kerekes M., Mody J., Kasza L.*: Lucr. Conf. Hep. Epid. Tg. M. 1957, 18; 6. *Kovács E., Mody J., Kerekes M.*: Lucr. Conf. Hep. Epid. Tg. M. 1957, 25; 7. *Kovács E., Kerekes M.*: (sub tipar); 8. *Kovács E.*: Studii și cerc. științ. 1954, V. 1—2, 414; 9. *Pospisil M.*: Zschr. ges. inn. Med. 1956, 21, 999; 10. *Putnam Fr. W.*: Protein Denaturation (Neurath H., Bailey K.: The Proteins. Ac. Press N. Y. Publ. 1953, Vol. I, part B, 807—892); 11. *Putnam Fr. W.*: Science (Lancaster) 1951, 122, 275; 12. *Wuhrmann F., Wunderly Ch.*: Die Bluteiweisskörper des Menschen, Benno Schwabe Verl. Basel. 1949.

ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ ПРОТЕИНОВ КРОВЯНОЙ СЫВОРОТКИ ПО ОТНОШЕНИЮ К СУЛЬФОЦИАНИДУ АММОНИЯ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

Е. Ковач, И. Модя, М. Керекеш

Авторы исследовали посредством электрофореза денатурирующее действие роданного аммония на белки в 50 нормальных и патологических случаях.

Помимо небольшого снижения альбуминов, отмечается резкое снижение гамма-глобулинов, при одновременном росте альфа- и бетаглобулинов. Последние две фракции обычно смешиваются и мигрируют, иногда со скоростью альфаглобулинов, а иногда — бетаглобулинов. Это явление наблюдается у здоровых людей при добавле-

нии 0,5 мл 60% раствора роданистого аммония к 2 мл сыворотки (конечная концентрация роданистого аммония 12%).

Кроме практически здоровых случаев были исследованы в упомянутых условиях сыворотки, взятые от больных, страдающих заболеваниями печени, сердца, почек, больных с септическим состоянием, от больных раком и пр.

У здоровых лиц денатурирование вызывает снижение гаммаглобулинемии на 10—15%, на 18—22% при нефритах, опухолях и на 30—50% при болезнях, сопровождаемых гипергаммаглобулинемией. Наиболее резкое снижение наблюдается при гипергаммаглобулинемиях гепатического происхождения. Это объясняется изменением белкового обмена веществ вследствие поражения печени.

L'ETUDE ELECTROPHORETIQUE DE LA STABILITE DES PROTEINES DU SERUM SANGUIN A L'ACTION DU SULFOCYANURE D'AMMONIUM DANS DIVERSES MALADIES

Kovács E., Módy J., Kerekes M.

On a étudié, à l'aide de l'électrophorèse, l'effet dénaturant du sulfocyanure d'ammonium sur les protéines, sur 50 cas normaux et pathologiques.

A côté d'une faible diminution des albumines, les gamma-globulines présentent une réduction impressionnante, avec une augmentation concomitante des alpha et des bêta-globulines. Ces deux fractions s'unissent en général, pour migrer tantôt avec la vitesse des alpha-globulines, tantôt avec celle des bêta-globulines. Ce phénomène apparaît dans le sérum des individus sains, quand on ajoute 0,5 ml de la solution à 60% du sulfocyanure d'ammonium à 2 ml de sérum (concentration finale du sulfocyanure 12%).

A côté des cas pratiquement sains, on a étudié dans les mêmes conditions, des sérum provenant de malades avec des lésions hépatiques, cardiaques, rénales, des maladies avec des états septiques, des tumeurs etc.

Chez les individus sains, la dénaturation provoque une baisse de 10 à 15% de la gamma-globulinémie, dans les nephrites et les tumeurs, une baisse de 18 à 22%, dans les maladies accompagnées d'hypergamma-globulinémie de 30 à 50%. La baisse la plus importante est observée dans les hypergamma-globulinémies d'origine hépatique. Ce fait s'explique par la modification du métabolisme protéique due à la lésion hépatique.