

Mateja Plavšak

Izolacija normalnega humanega gama makroglobulina in študij njegovega izginevanja iz zajčeve in človekove krvi



Predloženo kot doktorsko delo Medicinski fakulteti
v Ljubljani

junijs 1965

Vsebina

Uvod. Problem in delovna hipoteza.....	Stran	1
Splošni opis antiteles.....	"	3
Struktura antiteles	"	11
Biološko važne karakteristike normalnih gama makroglobulinov	"	17
Biosinteza antiteles	"	22
Katabolizem antiteles	"	24
Pregled znanih preparativnih tehnik za izolacijo normalnih gama makroglobulinov	"	28

Eksperimentalni del

1. Študij eksperimentalnih pogojev pri novi preparativni metodi za izolacijo gama makroglobulina (kombinacija kromatografije na A-50 in filtracije na gelu G-200	Stran	37
2. Priprava normalnega humanega gama makroglobulina za metabolicne poskuse		
A. Kromatografija na DEAE in filtracija skozi gel G-200.....	"	39
B. Filtracija skozi gel G-200 in preparativna elektroforeza	"	42
C. Kromatografija na A-50 in filtracija skozi gel G-200	"	45
3. Biološki eksperimenti		
A. Material in metode	"	50
B. Vrednotenje eliminacijskih krivulj..	"	53
C. Rezultati in diskusija	"	55
4. Zaključki	"	71
5. Bibliografija		

Uvod

Problem in delovna hipoteza

V okviru zelo heterogene družine antiteles nastopa imunokemijsko enovita skupina molekul, poznana pod imenom gama makroglobulin. Da gre za visokomolekularna antitelesa, je že dolgo poznano, vendar je njihova izredno visoka imunološka specifičnost in pomembnost jasna šele v zadnjih letih. Njihova biosinteza je stimulirana izključno s prisotnostjo antigenov, kar za razliko od ostalih serumskih beljakovin velja za vsa antitelesa. Njihova razgradnja je neodvisna od koncentracij v serumu, kar kaže na to, da gre za avtonomen degradacijski proces, različen od tistega pri 7S gama globulinih, kjer tako odvisnost lahko opazimo.

Kakšni mehanizmi urejajo specifični potek imunološke obrambne reakcije, rešujejo strokovnjaki na nivoju celične biologije. Kako se odražajo strukturne razlike med posameznimi antitelesi v njihovih bioloških funkcijah, je naloga specializiranih biokemikov. Moje raziskovalno prizadevanje je veljalo na eni strani študiju preparativnih metod za izolacijo gama makroglobulina iz seruma normalnih oseb, na drugi strani pa reševanju vprašanj, ki se pojavljajo v zvezi z njegovim katabolizmom. Dosedaj redki eksperimenti govorijo za to, da je življenska doba normalnega makroglobulina v cirkulaciji znatno krajša od življenjske dobe 7S gama globulinov. Prav nič ni znanega o tem, kje poteka njegova biološka degradacija.

Pri svojem delu sem zasledovala dve vprašanji: 1. Kako se eliminira humani makroglobulin iz organizma zajca v primerjavi s 7S gama globulinom in 2. kako se katabolizira homologni makroglobulin v človeku. Tu sem s preprostimi in relativno dostopnimi merilnimi in laboratorijskimi tehnikami poskušala ujeti skromen vpogled v dogajanja, povezana z njegovim izginevanjem iz krvi in telesa.

Del eksperimentov sem izvedla v teku svojega študijskega bivanja na Wright-Fleming Institut of microbiology v Londonu, deloma pa na Zavodu za transfuzijo krvi v Ljubljani, pri čemer je bilo neprecenljive vrednosti sodelovanje z Izotopskim laboratorijem Onkološkega instituta v Ljubljani. Delo sem razmnožila in tehnično opremila v času, ko bivam kot gost Švicarskega Rdečega križa na Theodor Kocher Institut v Bernu.

V vseh teh letih, odkar se ukvarjam z antitelesi, sem se marsikaj važnega naučila. Zato se imam zahvaliti predvsem svojim angleškim kolegom, ki so mi dve leti požrtvovalno pomagali preko začetniških težav in dr. Marjanu Erjavcu, ki mi je odprl nove aspekte in možnosti ter mi nadvse tovariško pomagal.

Zahvaliti se moram tudi kolektivu Zavoda za transfuzijo krvi in vsem tistim posameznikom, ki so mi pomagali omogočiti moja strokovna potovanja.

Bern, 1. maja 1965.

M.P.

SPLOŠEN OPIS ANTITELES

Imunološka obramba živalskega in človeškega organizma je vezana na kompleksno skupino beljakovin, imenovanih antitelesa (protisnovi, obrambne snovi), ki je po mnogih kriterijih sicer zelo heterogena, kaže pa izrazito sorodnost po svoji strukturi in funkciji. Prvotno so to frakcijo definirali kot komponento, ki se najpočasneje giblje v električnem polju pri alkalnem pH in jo imenovali gama globulin (1,2), vendar so že prav kmalu ugotovili, da gre za dve komponenti, ki se različno hitro gibljeta v centrifugalnem polju (1,3). Šele uporaba imunoelektroforetske tehnike je pokazala, da gre vsaj za tri različne komponente v okviru gama globulinov (4,5). Zaradi velike imunokemijske in biološke sorodnosti jih združujemo v posebno skupino s kolektivnim imenom "imunoglobulini" (Heremans, 5). Danes poznamo tri tipe antiteles, za katere najdemo v literaturi naslednje sinonime:

- i. Gama globulin (s.s.), 7S gama globulin, IgG, Gama₂ globulin
- ii. Gama makroglobulin, 19S gama globulin, IgM, Gama_{1M} globulin, beta_{2M} globulin
- iii. Gama_{1A} globulin, beta_{2A} globulin, IgA

Obrambna vloga prvih dveh je poznana že zelo dolgo (2,1), toda šele mnogo kasneje se je izkazalo, da je na frakcijo gama_{1A} vezana aktivnost takozvanih "reaginov" (6,7). 7S in 19S globuline so dosedaj dokazali pri vseh raziskovanih sesalcih in celo pri nekaterih nižjih vretenčarjih, medtem ko je frakcija gama₁ s sigurnostjo identificirana edino pri človeku.

V določenih proliferativnih stanjih plazmocitarnega in limfocitarnega sistema nastopajo v velikih količinah zelo

homogene frakcije paraproteinov, ki so po strukturi močno sorodni posameznim imunoglobulinom (8,9), čeprav njihova biološka funkcija še zdavnaj ni pojasnena. Ker jih je bilo relativno lahko izolirati v večjih količinah in v zelo čisti obliki, so služili za izčrpne študije o fizikalno-kemijskih lastnostih in strukturi, ki so dale dragocene podatke, saj jih je bilo v večini primerov mogoče aplicirati na normalne frakcije antiteles. Nekatere fizikalno-kemijske in biološke karakteristike normalnih imunoglobulinov so razvidne iz sledeče tabele:

Components Synonyms	7S γ -globulin γ -globulin γ_2 -globulin	γ_1 A-globulin β_2 A-globulin	γ_1 M-globulin β_2 M-globulin 19S globulin γ -macroglobulin
Serum Conc. g/100 ml	0.8-1.5	0.05-0.20	0.05-0.10
<i>Physico-chemical Properties</i>			
% N	15.6	16.2	14.5
% Carbohydrate	2.5	10.5	10.0
% Hexose	1.2	4.8	5.2
% Fucose	0.3	0.2	0.6
% Hexosamine	1.1	3.8	2.9
% Sialic Acid	0.2	1.7	1.7
Electrophoretic Mobility pH 8.6 (-10^{-5} cm ² V ⁻¹ sec ⁻¹)	-0.6-+3.0	+1.2-+3.6	About +2
Sedimentation Coefficient (S _{20,w})	6-7	7 (80-85%) 10-13 (15-20%)	18-20
Range of Salting Out (NH ₄) ₂ SO ₄ pH 7	1.2-1.8 M	1.3-1.8 M	1.1-1.6 M
<i>Biological Properties</i>			
Antibody Activity	+		+
Genotypic Specificity			
Gm	+	-	-
Inv	+	+	+
Placental Transmission	+	0	0
Skin Fixation	+	0	0
Combination with Rheumatoid Factor	+	0	0

Povzeto po Cohenu (10)

Nasplošno je precej enostavno izolirati iz seruma mešanico raznih antiteles (11). Težave nastopijo, ko želimo frakcionirati posamezne tipe gama globulinov, posebno makroglobulin ali gama_{1A} globulin. Preparativne metode slone na različni topnosti posameznih antiteles v vodi ali puferjih z nizko jonsko jakostjo, njihovem selektivnem obarjanju z določenimi kationi (npr. Zn⁺⁺), njihovi različni sedimentacijski hitrosti v

centrifugalnem polju, elektroforetskih in kromatografskih lastnostih in različnih molekularnih dimenzijah. Tako je makroglobulin nasplošno v vodi netopen (5), medtem ko sta ostala dva topna. Edino gama_{1A} ni mogoče oboriti s cinkovimi joni (5). Prav tako se medseboj razlikujejo po kromatografskih lastnostih na DEAE celulozi (12) in gibljivosti v elektroforezi v škrobnem gelu.

Prav tako so se izkazale kot uspešne razne metode, kjer lahko izoliramo specifična antitelesa iz njihovih kompleksov z antigenom (13).

7 S GAMA GLOBULIN

Ta frakcija je najdalj časa poznana in je bila vsled tega tudi najizdatneje študirana. Predstavlja 85-90% celokupnega gama globulina. Kot ostali imunoglobulini je tudi ta zelo heterogena v svojih fizikalno-kemijskih karakteristikah, kaže pa izrazito enovitost v svoji strukturi in funkciji (14). Njena velika heterogenost zaenkrat se ni pojasnena. Lahko da gre za veliko število raznih antiteles, ki so jih proizvedli različni celicni kloni (odtod morda homogenost njenega patološkega ekvivalenta- mielomskega paraproteina?). Ta domneva je sporna, saj so na eni strani avtorji našli, da so specifična antitelesa skoro v vseh parametrih bolj homogena od povprečnega gamaglobulinskega pula (15,16), medtem ko so spet drugi ugotovili pri obeh enako heterogenost (17). Vendar je bilo mogoče razbiti gama globulin na številne kromatografske subfrakcije, v katerih je bila antitelesna aktivnost neenakomerno razporejena (18). Zaenkrat še ni razčiščeno vprašanje "neimunega" gama globulina in eventualnih strukturnih razlik med njim in antitelesi. Razen omenjenih eksperimentov, v

katerih so izolirana in purificirana specifična antitelesa pokazala večjo homogenost od celotnega gama globulina, ni bilo zaenkrat mogoče dokazati nikakršnih razlik v fizikalno-kemijskih lastnostih. Prav tako so sporne razlike med mielomskimi in normalnimi gama globulini (19) in edinole v enem poročilu zasledimo, da so bile pri purificiranih mielomskih globulinih dokazane antigene determinante, ki jih ni najti v pulu normalnega gama globulina (20).

7S gama globulin ima veliko območje elektroforetske gibljivosti (od $0,5 - 1,3 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ sek}^{-1}$) pri pH 8,6 in jonski jakosti puferja 0,1 ter izoelektrično točko med 6-8 (14). Sedimentacijska konstanta S_{20}^0 je 6,5-6,7 in molekularna masa 150-190.000 (21). Kaže veliko elektroforetsko (5) in kromatografsko heterogenost (22). Elektronsko-mikroskopske studije ali študij difuzije skozi kolodijske membrane znene velikosti por kažejo, da je molekula gama globulina asimetrična z dolžinskim premerom 200-250 Å in širinskim 30-40 Å (30-70 Å pri mielomskih gama globulinih) (23,24). Humani gama globulin vsebuje 2,5% ogljikovih hidratov, katerih sekvenca in način vezave na molekulo še nista znana. Poznana je tudi aminokislinska sestava (25)

Gama globulin daje posebno črto v imunoelektroforetskem testu in eno samo v Ouchterlonijevem testu, vendar lahko s posebnimi antiserumi v omenjenih testih dobimo tudi podvojeno linijo. Mogoče je sklepati, da gre za skupini dveh različnih gama globulinov, ki se razlikujeta po antigenosti (da poleg skupnih nosita tudi vsaka zase specifične determinante (26), kar je v skladu s študijami, ki so odkrile dva antigensko razločljiva tipa med mielomskimi in Bence-Jones proteini (27). Mnogo je poznanega o genetskih variantah živalskih in humanih gama globulinov (25), kot tudi o antigeni sorodnosti med posameznimi antitelesi.

GAMA 1A GLOBULIN

Humani gama 1A globulin predstavlja okrog 5-10% količine celokupnega gama globulina (4,5). Relativno dobro je raziskan edinole pri človeku, kjer se v velikih količinah nahaja tudi v mleku, salivi in solzah in se izloča v urinu (28). Odgovarjajoča frakcija je bila opisana pri konjih, hiperimuniziranih z difteričnim in tetaničnim toksinom, kjer je bilo v njej mogoče določiti večino antitoksične aktivnosti. (29). Zelo podobno frakcijo so našli v serumu močno imuniziranih morskih prešičkov (30) in miši (31). V tej frakciji so našli aktivnost takozvanih "reaginov" (6,7), insulinskih antiteles (32) in izoaglutininov (33).

Gama 1A globulin je heterogen v svoji elektroforetski gibljivosti, ki je večja kot pri 7S gama globulinu in močno podobna gibljivosti makroglobulina : $1,2 - 3,6 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ sek}^{-1}$ pri pH 8,6 in jonski jakosti puferja 0,1 (5). Povprečna vrednost njene sedimentacijske konstante S_{20}^0 je ocenjena na 7S, vendar najdemo pri mielomskih proteinih tega tipa pogosto tudi hitreje sedimentirajoče komponente s sedimentacijskimi konstantami 10S, 13 in 15S, ki jih je mogoče z merkaptoetanolom razbiti na 7S enote (34). Vsebuje kvalitativno in kvantitativno podobno količino ogljikovih hidratov kot gama makroglobulin. Ker so čiste frakcije gama 1A globulina težko dostopne, je njegova struktura le slabo poznana.

19 S MAKROGLOBULIN

zastopa približno 5-10% celokupnega gama globulina v serumu in približno 1% celokupnih serumskih beljakovin (11). Dokazali so ga v serumu mnogih species, vključno zajca (35), miši (36), konja (37) in kokoši (38). Izključno na to frakcijo so vezane številne biološko važne substance, kot naprimer hladni aglutinini, antitelesa proti *O* Salmonella antigenu in reumatoidni faktor. Druge spet, kot naprimer izohematoaglutinini, anti-tiroglobulinska antitelesa in antitelesa v Wassermanski reakciji, nastopajo v 7S in 19S frakciji gama globulina. (39,40). Vse kaže na to, da predstavljajo makroglobulini v zgodnjih fazah imunizacije edini tip antiteles (glej prih. poglavje). Dokazana je najožja imunološka sorodnost med normalnimi makroglobulini in paraproteini v takoimenovani Waldenströmovi makroglobulinemiji(41), kar je razvidno iz številnih studij (39), čeprav kažejo drugi nekoliko večjo homogenost in so se v literaturi celo pojavile trditve, da jim manjkajo določene antigene determinante, ki so sicer tipične za normalne makroglobuline(42).

Iz podatkov, dobljenih pri študiju najrazličnejših preparacij makroglobulina (predvsem patoloških), je mogoče sklepati, da ima ta zelo veliko območje elektroforetske gibljivosti, saj se pojavlja včasih (običajno) v predelu gama globulina, najdemo pa ga celo v predelu beta in alfa globulinov ali celo bliže katodi. Elektroforetska gibljivost je bila točno določena edino pri reumatskem faktorju(43), kjer znaša $1,1-1,5 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ sek}^{-1}$. Izoelektrična točka makroglobulinov je bila ocenjena na 5,1 -7,7 (44) in njegova sedimentacijska konstanta S_{20}^0 na 19S. Vendar najdemo v vseh preparacijah normalnih in patoloških makroglobulinov tudi komponente z višjimi sedimentacij-

skimi konstantami, ki kažejo imunološko specifičnost makroglobulinov (39, lastna izkustva). Pri človeku natančnih podatkov o molekularni masi makroglobulinov nimamo, vendar se ta nasplošno ocenjuje na 1,000.000, medtem ko je bila določena pri prešiču na 870.000 (45) in pri patoloških makroglobulinih na 745 ± 20.000 (46). Podatki hidrodinamičnih metod (viskoznost, sedimentacija) ter elektronske mikroskopije kažejo na to, da je molekula gama makroglobulina sferične oblike z diametrom 120 - 250 Å (46, 47), ki je kljub visoki hidrataciji makroglobulinske molekule enako velik, če je merjen z elektronsko mikroskopijo ali v raztopini. Makroglobulini so zelo bogati z ogljikovimi hidrati (10%), katerih vsebujejo mnogo več kot 7S ali mielomski globulini. Ta vrednost je zelo stalna pri različnih normalnih ali patoloških makroglobulinih in se zelo približuje vrednostim, ki veljajo za alfa makroglobuline (39).

Številni avtorji so predpostavljali, da gre v primeru gama makroglobulinov za višje polimere, sestavljene iz pet do šest 7S enot in ne za samostojno vrsto antiteles. To domnevo so še posebno potrjala opažanja, da kažejo 7S in 19S gama globulini določeno sorodnost v imuno-precipitacijskem testu ("cross reaction"). Vsi poskusi, da bi polimer razbili v kislem ali alkalnem mediju ali v visokih koncentracijah sečnine, so ostali brez uspeha. Deutsch in Morton (48) ter drugim (49) je uspelo z merkaptoetanolom in drugimi sulfhidrili reducirati disulfidne mostove v makroglobulinski molekuli in to razbiti v monomerne enote s sedimentacijskimi konstantami 7S. Pri številnih makroglobulinih (antitelesih, reumatoidnem faktorju, krioglobulinih) je taki redukciji sledila popolna izguba antitelesne aktivnosti oz. aktivnosti reumatoidnega faktorja in krioprecipitacije. Ponovno zdru-

ženje tako dobljenih podenot lahko preprečimo, če nastale sulfhidrilne skupine blokiramo z acetamidom. Če pa z dializo previdno odstranimo merkaptoetanol, podenote spet reasociirajo v intaktne makroglobulinske molekule, ki se po fizikalno-kemijskih kriterijih ne razlikujejo od matičnih molekul in ki regenerirajo 25-75% svoje antitelesne aktivnosti (48).50). Če na reduktiven način obdelujemo antitelesa dveh specificnosti in jih po redukciji rekombiniramo, dobimo "mešana antitelesa" (51). To potrjuje, da je biološka aktivnost, izražena v terciarni strukturi posameznih molekul, v bistvu pogojena s primarno strukturo, ki je predeterminirana v času sinzeze (52).

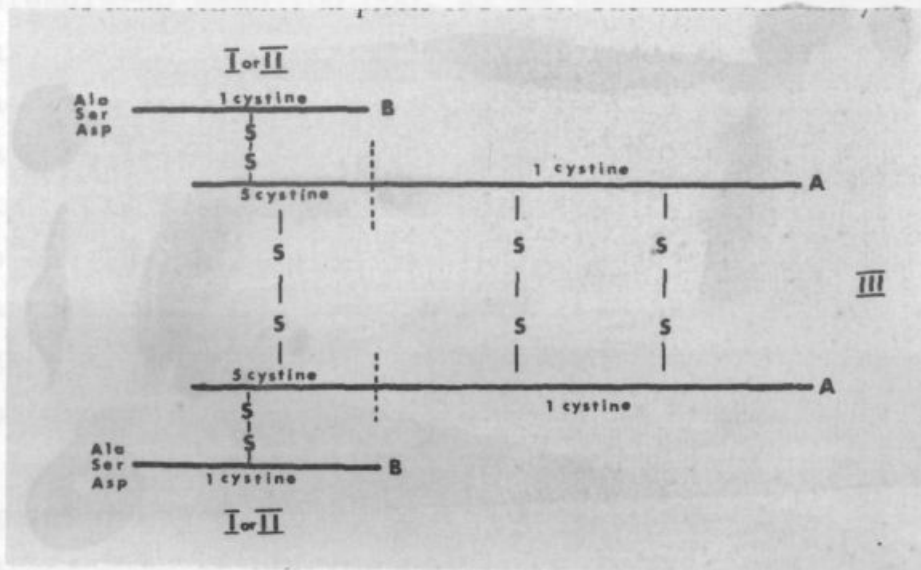
Čeprav imajo monomeri makroglobulinskih molekul nekaj skupnih determinant s 7S gama globulinom, kažejo obenem dovolj izraženo specifičnost, da je vsak dvom v individualnost makroglobulinskih antiteles neupravičen.

STRUKTURA ANTITELES

Potreba po poznavanju bioloških funkcij posameznih antiteles in razumevanju genetskih mehanizmov, ki urejajo njihovo sintezo, je v zadnjih letih privedla do obsežnih študij njihove strukture. Podroben kronološki potek posameznih raziskav in njihovih rezultatov je razviden iz odličnih revijskih člankov Cohena in Porterja (25), Franklina (53), Nisonoff + Thorbeckejeve (54) in drugih.

Na eni strani so avtorji poskušali s specifičnimi proteolitskimi encimi na točno definiranih mestih razbiti molekule antiteles (pretežno 7S gama globulina) v podrejene enote, ki bi ohranile biološke lastnosti nativnih molekul (55, 56).

Na drugi strani pa so z reduktivnim cepljenjem S-S vezi v molekuli gama globulina prišli do peptidnih verig, ki so posebno prikladne za imunokemijske študije (57, 58, 59, 60). Eksperimentalni podatki, dobljeni s kombinacijo obeh postopkov, so dali bazo za diagram, s katerim je Porter (61) leta 1962 ponazoril strukturo gama globulina:



Struktura zajčjega gama globulina (Porter, 1962)
 S-S = bisulfidne vezi med posameznimi peptidi (A in B člani)
 = mesto hidrolitskega cepljenja s papainom

Proizvajalцем terapevtskih hiperimunih serumov je že dalj časa poznano, da je možno gama globulin hidrolitsko cepiti v manjše dele z molekularno maso okrog 100.000, ne da bi pri tem padla sposobnost precipitacije antigena (62). Porter (55) je pokazal, da je mogoče s kristaliničnim papainom, aktiviranim s cisteinom, razcepiti zajčji gama globulin v tri fragmente, ki jih lahko kromatografsko ločimo. Pri tem razcepimo v molekuli peptidne in S-S vezi (63). Največji fragment (III) ima molekularno maso 80.000, z lahkoto kristalizira in nima antitelesne aktivnosti. Videti je, da so na njega vezane determinante, ki odločajo o prehodu skozi fetalne membrane, fiksaciji na kožo, aktivaciji komplementa in kombinaciji z reumatoidnim faktorjem. Dela I in II sta simetrična, imata molekularno maso 50.000, ne precipitirata antigena, vendar pa inhibirata reakcijo intaktnih antiteles z antigenom. Opisana sta kot "monovalentna" antitelesa, od katerih vsak obsega samo eno "combining site". Peptično cepljenje zajčjega gama globulina uniči fragment III, ohrani pa del z molekularno maso 100.000, ki še vedno reagira z antigenom. Redukcija ene same disulfidne vezi da dva peptida z molekularno maso 50.000, ki sta zelo podobna papainskima fragmentoma I in II. (64). Reakcija je delno reverzibilna, tako da lahko z rekombinacijo peptidov dobimo fragment z molekularno maso 100.000, ki ima dvoje različnih combining sites. Papainsko cepljenje humanih gama globulinov je dalo podobne fragmente. Vecjemu delu, je analogen fragment S (slow), ki se počasneje giblje v elektroforezi na skrobu in zavzema dve tretini molekule. Preostala tretina je fragment F (fast) (65). Fragment S lahko razbijemo v dva simetrična dela A in C (analoga I in II pri Porterju), od katerih ima vsak po eno combining site. Fragment F (ali B) nima antitelesne aktivnosti (66).

Po podatkih, ki jih je dalo encimatsko cepljenje gama globulinske molekule, je postalo aktualno vprašanje, iz koliko peptidov je vsaka molekula pravzaprav sestavljena. Določanja N-terminalnih aminokislin z raznimi metodami (16,67) pri raznih species niso dala enotnih rezultatov, čeprav kažejo gama globulini raznih vrst nasplošno izredno podobnost. Edelmanu (57) in Edelmanu + Pouliku (68) je uspelo z redukcijo gama globulina z merkaptoetanolom v visokih koncentracijah sečnine dokazati, da ta sestoji iz več peptidnih verig, ki so povezane medseboj z disulfidnimi mostovi, ki pri redukciji razpadejo. Če je nastale produkte analiziral v elektroforezi v škrobnem gelu (v 8M sečnini, pH 3,5), je bilo mogoče razlikovati dve komponenti z različno gibljivostjo: H (heavy chain) in L (light chain), kateri je bilo mogoče preparativno ločiti s kromatografijo na CM celulozi v raztopini sečnine. Izplen takih separacij je bil reven, prav tako so bile dobljene frakcije brez kakršnekoli biološke aktivnosti in so bile topne le v visokih koncentracijah sečnine. Cecil in Wake (69) sta prav takrat pokazala, da je s sulfiti mogoče reducirati interpeptidne disulfidne grupe, ne pa intra-peptidnih, in to v vodnih raztopinah, kar je napotilo Porterja in sodelavce (58), da so postopek redukcije z merkaptoetanolom modificirali in ga izvedli v vodni raztopini, pri pH 8,2, pri čemer so reducirali pet disulfidnih skupin (glej diagram). Nastale sulfhidrilne skupine so blokirali z acetamidom, da bi preprečili reagracijo, in nato po dializi proti N ocetni ali propionski kislini s pomočjo filtracije na gelu G-75 ločili dve komponenti, imenovani člen A in člen B. Frakciji sta identični z Edelmanovim H in L členom, če ju analiziramo v škrobni elektroforezi, z razliko, da ohranita precej bioloških sposobnosti in da je njihov izplen kvantitativen (74 % A in 26 % B). Molekularna masa znasa za člen A

52.000 in člen B 20.000 (70), kar daje povod za zaključek, da je vsaka molekula gama globulina sestavljena iz dveh peptidnih parov (en par tipa A in en par tipa B). To potrjujejo aminokislinske analize posameznih členov in njihove primerjave z analizami intaktnih molekul. (71). Vsi ogljikovi hidrati so vezani na člen A. Redukcija papainskih fragmentov I in II je dala dve komponenti, od katerih je ena po vseh analiziranih kriterijih identična s členom B, kar nakazuje možnost, da je mesto hidrolitskega posega, ki ga izvrši papain, pravilno označeno (glej shemo).

Razmere v okviru normalnih in patoloških gama globulinov je raziskal Cohen (72). Pri redukciji (58) vseh treh tipov antiteles ali odgovarjajočih paraproteinov, je dobil peptide A in B, ki so pri vseh nastopali v istem razmerju (75% + 25%). V elektroforezi v škrobnem gelu (8M sečnina v mravljični kislini) je primerjal redukcijske produkte posameznih frakcij in prišel do zanimivih zaključkov: členi B vseh normalnih in patoloških antiteles se gibljejo z isto elektroforetsko hitrostjo, vendar pa kažejo pri patoloških frakcijah izrazito večjo homogenost kot pri normalnih (ozka, definirana proga v primeri s širokim difuznim pasom pri normalnih frakcijah). Peptidne verige A se pri posameznih tipih gibljejo z različno hitrostjo, vendar je ta ista za člen A pri normalnih in patoloških frakcijah v okviru istega tipa. Nadalje je ugotovil, da si členi B delijo skupne antigene determinante (identičnost v imuno-difuzijskem testu) pri vseh normalnih in patoloških frakcijah. Peptidi A kažejo strogo specifičnost, tako pri normalnih kot pri patoloških frakcijah vseh tipov. Zato je videti več kot verjetno, da imajo posamezna antitelesa identične (ali vsaj zelo podobne) člene B in da se razlikujejo le po peptidnih vzorcih svojih členov A. To domnevo močno podpirajo ugotovitve avtorjev, ki so našli, da se an-

tigena karakteristika (genetski faktor) Gm nahaja le pri 7S gama globulinu, medtem ko se druga, takozvani faktor Inv, pojavlja pri vseh treh tipih (73, 74). V zadnjem času (75) so ugotovili, da se prva nahaja na členu A, druga pa na B členu gama globulinske molekule. Kemično najbolj otipliva razlika med posameznimi členi je razlika v količini njihovih ogljikovih hidratov, ki se tudi nahaja na členu A. Grupno specifične determinante I in II, ki so skupne vsem gama globulinom, se nahajajo na členu B.

Ker leži sposobnost za kombiniranje v papainskem fragmentu I + II, je bilo treba razčistiti, kateremu od obeh peptidov ta lastnost pripada in ali ne nastane šele po njuni kombinaciji. Pri konju je bilo mogoče najti 70-80 % sposobnosti za kombinacijo z antigenom v fragmentu A, kar utegne veljati za antitelesa vseh species. Nič še ni znanega o kemični strukturi posameznih aktivnih mest v molekuli. Zanimiva je bila ugotovitev, da so antitelesa morskega prešicka z različno specifičnostjo pokazala različne elektroforetske vzorce svojih B členov (76), kar utegne navajati k zaključku, da utegnejo tudi B členi prispevati k oblikovanju specifičnih, za kombinacijo z antigenom določenih mest v molekuli antitelesa.

Z veliko verjetnostjo predpostavljamo, da se členu A in B neodvisno sintetizirata, saj je na eni strani študij genetsko kontroliranih lastnosti pokazal, da se te nahajajo ločeno na posameznih členih; na drugi strani pa se v določenih patoloških stanjih (naprimer mielomatozah) členu B soroden (identičen) peptid sintetizira v prebitku in izloča v urinu (Bence Jones protein). Cohen (77) je pokazal, da se v urinu normalnega odraslega izloči dnevno 5-10 mg beljakovin, ki nosijo determinante členu B. Na drugi strani pa je Edelman

ugotovil, da kažejo Bence Jones proteini ter členi B, pripravljene iz normalnih ali mielomskih globulinov, isto posebnost v termosolubilitetnem testu (78).

Na drugi strani pa je Franklin (79) odkril pacienta, pri katerem gre za prebitek v sintezi člena A, ker je bilo mogoče v serumu in urinu določiti 3,5 S komponente, ki so kazale iste antigene determinante kot člen A.

V raznih laboratorijih so v teku zanimive raziskave o sintezi antiteles, oziroma omenjenih peptidnih enot, na podlagi tkivnih kultur, pripravljenih iz različnih organov imuniziranih živali. (80).

BIOLOŠKO VAŽNE KARAKTERISTIKE NORMALNIH GAMA MAKROGLOBULINOV

Poznano je, da predstavljajo gama makroglobulini takoimenovani "zgodnji tip" antiteles v imunološki obrambni reakciji živali in človeka, saj se kot prva pojavi v odgovoru na antigeni dražljaj (53 in podrobneje 81 - 85) v primarnem imunološkem odgovoru (primary response). Kasneje ugasne njihova sinteza in nadomeste jih postopoma antitelesa tipa 7S, s čimer se imunološki proces nadaljuje. Le v redkih primerih je njihova sinteza dolgotrajnejša. Sistematsko sta ta pojav raziskala Talmage in Faliafero (86, 53), ki sta ugotovila, da imajo zgodnja antitelesa makroglobulinskega tipa izredno visoko hemolitsko aktivnost, ki je dosti manjša pri kasnejšem 7S tipu. Najbrž je tudi pri človeku hemolitska aktivnost vezana predvsem na makroglobulinski tip antiteles (87). Zanimivo je, da kažejo zgodnja antitelesa izredno visoko specifičnost za antigen, to je, da le malo ali pa sploh ne reagirajo v navskrižnem imunodifuzijskem poskusu s sorodnimi antigeni (62, 87, 88), naprimer plazma albumin dveh species, ki taksonomsko nista zelo oddaljeni. Pač pa imajo za razliko od nizkomolekularnih antiteles makroglobulinska antitelesa (zgodnja antitelesa) manjšo avidnost (62, 89, 90). Pojm avidnosti pove, da je vez med antigenom in ustreznim antitelesom šibka in da kompleks laže razpade. V nadaljnjih fazah imunizacije postanejo antitelesa manj specifična in bolj avidna.

Isto zaporedje v biosintezi obeh tipov antiteles opažamo tudi v ontogenezi (91, 92, 93). Znano je, da makroglobulini ne prehajajo skozi placentarno bariero (94) in da so antitelesa novorojenčka, izvirajoča iz materinega krvotoka, izključno 7S tipa. Po prvih 4 - 6 mesecih po rojstvu pade nivo gama globulina, nakar se zopet začne počasi dvigati ob

očiti proliferaciji plazmatskih celic in pri enem letu doseže nivo normalnega odraslega. Do nedavnega je veljalo mnenje, da dojenček v prvih 4-6 mesecih ni sposoben proizvajati lastnih antiteles, vendar so Smith (91) in drugi (92, 93) dokazali, da ob ustreznem antigenem stimulusu novorojenček reagira s sintezo makroglobulinskih antiteles. Po dveh do štirih tednih sinteza makroglobulina pade, pri čemer jo nadomesti sinteza gama globulinskih molekul (78). Silverstein (95) je pokazal, da je imunološka obrambna reakcija pri novorojenčku kvalitativno in kvantitativno podobna tisti pri odraslem, le da so količine proizvedenih antiteles pod spodnjo mejo dokazljivosti. Pri novorojenčkih traja 19S faza dalj časa kot pri odraslem (81) in je v določenih primerih podaljšana po obsevanju z rentgenskimi žarki (96). Možno je, da sintetizirajo vsakega od obeh tipov antiteles različni celični kloni, ali pa, da ista celica proizvaja oboje antiteles, pri čemer je bila zaradi omenjenega posega njena diferenciacija zavrnjena ali prekinjena (54). Najnovejša poročila omenjajo, da je bilo mogoče z zelo nizkimi dozami virusnih antigenov obdržati sintezo antiteles v primarnem imunološkem responsu na stopnji makroglobulinske sinteze brez formacije 7S antiteles, vsled česar je izostal sekundarni (booster) response. Te studije kažejo, da je bila sinteza antiteles diskontinuirana zaradi pomanjkanja antigena in da je bilo mogoče po tem spet izzvati normalen imunološki odgovor organizma preko začetne sinteze makroglobulinskih antiteles (54, 97). V teh pojavih leži nemara razlaga za takoimenovani "low dose paralysis effect", ki ga opisuje Dresser (98). Zelo verjetno je, da obsega že primarni odgovor na antigen dve fazi : prvo, v kateri odgovori s sintezo makroglobulinskih antiteles, in drugo (eventualni booster , dosedaj opisan le v sekundarnem odgovoru na antigen)

v kateri se proizvajajo 7S antitelesa, če je količina antigena zadoščala za ponovno stimulacijo "senzibiliziranih" celic (54).

Sinteza 19S makroglobulina začne kmalu po rojstvu in doseže normalne vrednosti odraslega pri 4-6 mesecih. Zanimivo je, da vstopi sinteza gama 1A globulina mnogo kasneje (po 4-6 mesecih življenja) in da otroci šele po 12 letu dosežejo normalne vrednosti odraslega.

Precej podrobno nam je poznana razporeditev 7S gama globulina v organizmu, prav tako tudi njegova metabolična usoda. Malo pa je v obeh ozirih znanega o 19S makroglobulinu, ter prav nič o gama 1A globulinu. Težavnost leži predvsem v zahtevi po zelo čistih preparacijah omenjenih frakcij, od katerih vemo, da je predvsem makroglobulin zelo nestabilen tudi v procesu radioaktivnega jodiniranja. Do nedavnega edini podatki nudita Cohen in Freeman (99), da se ^{131}J humani makroglobulin eliminira iz organizma mnogo hitreje kot normalni 19S gama globulin. Katabolični razpolovni čas znaša za makroglobulin 2-3 dni, medtem ko je ta za 7S gama globulin 21-26 dni. Medtem ko najdemo 50% 7S gama globulina v ekstravaskularnem prostoru, je makroglobulin omejen izključno na intravaskularni prostor. Taliafero + Talmage (100) sta se izognila nevarnosti denaturacije zaradi radioaktivnega markiranja s tem, da sta merila padec antitelesne aktivnosti pasivno prenesenih antiteles iz imuniziranih zajcev v neimunizirane (antitelesa proti ovčjim eritrocitom ali toplotno denaturirani stromi eritrocitov). Biološki razpolovni čas hemolitske aktivnosti, vezane na visokomolekularna antitelesa, je znašal $2,81 \pm 0,12$ dni; v nasprotju z nehemolitsko aktivnostjo manjših molekul, kjer je bil ta daljši in je bil ocenjen na $5,55 \pm 0,12$ dni. Od prvih je zapustilo cir-

kulacijo 17%, od drugih 60%. Mnogo višji razpolovni čas so določili pri makroglobulinih, pripravljenih iz seruma makroglobulinemičnih bolnikov (101, 102), kjer so ugotovili, da znaša razpolovni čas 6,5-13 dni. Izdatne podatke nudi šele pred kratkim dostopna revija Faheya in sodelavcev (103), ki analizira metabolizem normalnih in patoloških makroglobulinov v zdravem in bolnem organizmu. Katabolizni razpolovni čas normalnih makroglobulinov znaša 5 dni, za razliko od 23 dni pri normalnih 7S gama globulinih. Po njegovih meritvah in izračunih se dnevno katabolizira 14% celokupnega makroglobulina (in le 3% 7S gama globulina). Koncentraciji obeh frakcij v serumu (0,1 g/100 ml za 19S in 1,29 g /100 ml za 7S gama globulin) ne dajeta torej objektivne predstave o količini njune sinteze. Tako predstavlja 19S makroglobulin le 5-10% koncentracije 7S gama globulina, njegova dnevno sintetizirana količina pa znaša 15 -20% dnevno sintetizirane količine 7S gama globulina. Le 18% celokupnega makroglobulina se nahaja v ekstravaskularnem prostoru, medtem ko ta vrednost doseže višino 60% pri 7S gama globulinu. Verjetno leži tudi v tem dejstvu ena mnogih bioloških razlik med obema tipoma antiteles, katere fiziološki pomen še ni znan: medtem ko humani 7S gama globulin senzibilizira kožo morskih prešičkov za pasivno kutano anafilaksijo (se "fiksira"na eno od komponent kože, verjetno na žilni endotelij), 19S gama globulin te lastnosti nima (niti gama 1A globulin). Ali naj to pomeni, da sta življenjski prostor in delovišče makroglobulina omejena na intravaskularni prostor in ta ni zapleten v tkivne imunološke reakcije? Z ozirom na to, da so makroglobulinska antitelesa prva, ki se sintetizirajo v odgovor na antigeni dražljaj, je morda smotrno, da se zadržujejo predvsem v ožilju in skrbe za čim hitrejšo in čimuspesnejšo eliminacijo antigena. Ko jim kasneje zaradi nepojasnjenih mehanizmov slede antitelesa

z manjšimi molekulami, njihova vloga zbledi in je morda celo ugodno, da se čimprej razgradijo (103). Na njihovo imunološko "učinkovitost" lahko nemara sklepamo na podlagi podatkov o njihovi valenci, ki je dosti večja kot pri 7S gama globulinih (kjer je 2) in znaša lahko celo do 12. V primeru reumatskega faktorja, katerega nasplošno opisujejo kot "anti-7S gama-antitelo", so ugotovili, da lahko vsaka molekula makroglobulina kombinira s pet do šest molekulami 7S gama globulina.

Reumatski faktor je poleg hladnih aglutininov edino z gotovostjo identificirano auto-antitelo makroglobulinskega tipa (105). V serumu bolnikov z reumatoidnim artritisom so dokazali imune komplekse s sedimentacijsko konstanto 22S, iz katerih so lahko eluirali reumatoidni faktor, ki je kazal vse karakteristike in specifičnost 19S makroglobulina in je tudi in vitro reagiral z autolognim 7S gama globulinom.

Velike biološke važnosti je že prej omenjeno dejstvo, da gama makroglobulini ne prehajajo skozi fetalne membrane (kot tudi ne gama 1A globulini), saj v nasprotju od 7S gama globulinov ne ogrožajo fetusa v primerih ABO in Rh inkompatibilnosti ter eventualno drugih neskladnosti z materjo.

BIOSINTEZA ANTITELES

Prve in najvažnejše podatke o celularnem izvoru gama globulinov so dala razna klinična opažanja, iz katerih je bilo mogoče zaključiti, da je njihova sinteza vezana na celice limfocitarne in plazmocitarne vrste. V primerih kongenitalnih agamaglobulinemij se to izraža skoraj v popolnem izostanku plazmocitov in delno limfocitov (106), kot pri novorojenčkih (91) in eksperimentalnih živalih, vzgajanih v aseptičnem okolju (107).

Na drugi strani pa je neoplastična proliferacija plazmocitov in delno limfocitov pri raznih mielomatozah in Waldenströmovi makroglobulinemiji, kot tudi pri transplantaciji eksperimentalnih tumorjev, povezana z nastankom velikanskih količin paraproteinov, ki se navidez ne ločijo od normalnih gama globulinov. Kljub temu, da so pri novorojenčkih dokazani aktivni obrambni mehanizmi proti H-antigenu *Salmonelle typhi* (91) v obliki sinteze makroglobulinskih antiteles, pri tem ni mogoče zaslediti formiranja plazmocitov, katerih proliferacija nastopi kasneje, med 4-6 mesecem življenja, ko istovrstna antigena stimulacija rezultira v tvorbi obojevrstnih antiteles (19S in nato 7S).

Fluorescenčne študije so pokazale, da lahko v plazmocitih najdemo antitelesa vseh treh tipov (109), da pa se 19S gama globulin lahko sintetizira tudi v odsotnosti tipičnih plazmocitov, verjetno v velikih limfoblastih, za katere je poznano, da predstavljajo predhodnike plazmocitov, eventualno pa tudi limfocitov. Antitelesa so dokazali tudi v malih limfocitih. Iz nepreglednega števila najrazličnejših podatkov je zaenkrat nemogoče razbrati vlogo posameznih vmesnih stopenj v razvoju plazmocitov in limfocitov in oceniti pomen celične diferenciacije z ozirom na očiti dvofazni potek imunološkega odgovora. Vse kaže na to, da je sinteza antiteles povezana s celičnim

razmnoževanjem (111), kot tudi z replikacijo subcelularnih enot (112), na kar kaže tudi logaritmični porast količine antiteles kot funkcija števila senzibiliziranih celic, kot tudi inhibitorni efekt, ki ga na sintezo antiteles izvaja sevanje rentgenskih žarkov in DNA antagonisti (113), ter seveda latentna faza v imunološkem odgovoru, ki traja od administracije antigena do pojave prvih antiteles. v cirkulaciji.

S študijem praznih fenomenov, kot so v prvi vrsti imunološka toleranca, bo v bodočnosti morda uspelo razčistiti nešteta vprašanja, ki so danes se odprta in nakatere ne vemo odgovora. Kakšna je vloga primarnih limfoidnih organov (timusa) v formiranju imunološke kompetence, vezane na sekundarne limfoidne organe (vranica in limfne žleze). Kakšni mehanizmi dirigirajo potek celičnih diferenciacij in ali so razlike med zgodnjimi in poznejšimi fazami imunološkega odgovora le kvantitativne, ali pa tudi kvalitativne. Ali sta v sintezo zgodnjih in poznejših antiteles vmešana dva različna celična tipa, oz. ali lahko ista celica, oziroma njeni neposredni potomci, proizvajata v začetku 19S, in kasneje 7S antitelesa (Nossal, 114).

Brez dvoma je kontakt z antigenom bistveni (če ne edini) faktor pri sintezi antiteles (115). Znano je, da organizem ne pokaže kompenzatoricne sinteze antiteles v primerih, ko je njihov katabolizem iz različnih vzrokov pospešen (gastroenteropatije, nefroze) (103), čeprav je sinteza večkrat iz nepojasnjenih vzrokov močno zvišana (mielomatoze, Waldenströmova makroglobulinemija). Zvišano sintezo gama globulinov opazimo tudi v primerih kroničnih infekcij, naprimer pri malariji (116). Kakšni vzroki privedejo do podobnega zvišanja gama globulinske sinteze pri jetrni cirozi, še ni pojasneno.

KATABOLIZEM ANTITELES

Nasplošno velja mnenje, da poteka katabolizem imunih kompleksov (kompleksov antigen-antitelo) v retikuloendotelialnem sistemu (117), prav tako tudi katabolizem različno denaturiranih antiteles. Pojavile so se domneve, da se odvija katabolizem nativnih antiteles v celicah, ki ga proizvajajo, to je v plazmocitih (118). Vendar so perfuzijski eksperimenti z antitelesi, ki so šla predhodno skozi bioloski "skreening", pokazali, da se naprimer v jetri, v kateri se antitelesa definitivno ne sintetizirajo, razgradi okrog 30% nativnega 7S gama globulina(119). Zelo verjetno je, da se nativna antitelesa katabolizirajo v celicah jetrnega parenhima in ne v Kupferjevih celicah. Eksperimenti z blokiranjem retikuloendotelialnega sistema so pokazali, da je padel katabolični iznos toplotno denaturiranih, ne pa nativnih antiteles (120).

Iz podatkov v literaturi je mogoče sklepati, da predstavljajo Kupferjeve celice selektivni sistem za fagocitozo večjih kolloidov. Raziskovanja na tem področju so se odprla z uporabo kolloidnega zlata Au-198 (121), kolloidnega fosforja P-32 (122) in predvsem po tem, ko je Benaceraf (123) za slične eksperimente uporabil molekularne agregate, dobljene s termično obdelavo humanega albumina**. Vse te omenjene metode so služile predvsem študiju hepatalne cirkulacije v diagnostične namene (124). Vendar se mi je v teku sodelovanja na teh problemih vsililo vprašanje, kako se vendar katabolizirajo makroglobulinska antitelesa, ki odločno padajo v red velikosti, ki je videti merodaven za fagocitozo v Kupferjevih celicah. Te namreč fagocitirajo delce v velikosti od 0,005 - 1,0 mikrona (125)(126), ne pa manjših, medtem ko se večji agregati embolizirajo že v pljučnih kapilarah.

** na jetra odpade le 10% celokupnega kataboličnega iznosa pri nativnem albuminu (119).

Z elektronsko mikroskopijo in drugimi meritvami je bilo ugotovljeno (46,47), da so molekule makroglobulinskih antiteles sferične oblike in da znaša njihov premer 120-250 Å (12-25 milimikronov) ali celo 300 Å (30 milimikronov) (127). O veliki hitrosti njihove eliminacije v primeru z eliminacijo (katabolizmom) 7S gama globulina sem podrobno poročala že v poglavju Bioloske karakteristike antiteles. Da je ta lahko v precejšnji meri odvisna od velikosti njegovih molekul, je mogoče sklepati iz precej odgovarjajočih podatkov o eliminaciji albuminskih mikroagregatov, katerih molekularni premer pada v isti red velikosti (124), lastnih eksperimentalnih podatkov o eliminaciji alfa makroglobulinov (198), in še hitrejših eliminacij hemocianina iz organizma poskusne živali (128)

Nadvse vzpodbudni so zaključki Bartha i.dr. (103), ki s podrobno analizo primerjajo katabolizem normalnega 7S in 19S gama globulina v zdravem organizmu in v raznih disproteinemskih stanjih. Poleg že poznanega dejstva, da se makroglobulin hitreje eliminiira iz organizma kot 7S gama globulin in da se v manjši meri sintetizira, so ugotovili, da njegov katabolični iznos ni odvisen od njegove koncentracije v serumu oziroma njegovega intravaskularnega pula. Preživetje makroglobulina =njegov katabolični "razpolovni čas" je bil v bistvu isti pri normalnih kontrolnih primerih, kot pri bolnikih z izrazito znižanim nivojem gama makroglobulina v serumu (agamaglobulinemije), ali pa pri močno izraženih makroglobulinemijah. Prav tako neodvisno od serumske koncentracije se v katabolizmu obnašata fibrinogen (129) in ceruloplazmin (130), medtem ko je bilo mogoče ugotoviti direkten odnos med serumsko koncentracijo in frakcijskim kataboličnim iznosom pri 7S gama globulinu (131, 132) in morda pri albuminu (133). Za razliko od makroglobulina, je katabolični iznos pri 7S

zvišan pri večini hiperproteinemij zaradi kroničnih infekcij ali hiperimunizacije in pri multiplem mielomu s 7S gama paraproteinom, ter normalen ali celo znižan pri bolnikih z agamaglobulinemijo ali makroglobulinemijo, kjer je bila količina 7S gama globulina znižana (103). Vsa ta opažanja lahko združimo v logičen zaključek, da odločata o katabolizmu 7S in 19S gama globulinov d v a r a z l i č n a m e h a n i z m a.

S študijem katabolizma homolognih in heterolognih 7S gama globulinov v veliki poskusni seriji (145) so ugotovili, da je molekularna struktura, ki odloča o hitrosti in načinu eliminacije, locirana na papainskem fragmentu III. Pri vseh species je bila hitrost eliminacije ^{131}J papainske frakcije III korelirana s hitrostjo eliminacije odgovarjajočih nativnih (intaktnih) molekul 7S gama globulina, medtem ko sta papainska fragmenta I+II ter pepsinski fragment (ki odgovarja fragmentoma I+II) bili rapidno katabolizirani. Aktivnost, prvotno vezana na papainski fragment III, se je pojavljala v urinu v glavnem kot neproteinska radioaktivnost, medtem ko sta bila fragmenta I+II (in tudi pepsinski fragment) v veliki meri izločena v obliki proteinsko vezane radioaktivnosti. Naj povdarim, da je vsled teh dognanj močno omajana profilaktična vrednost na široko uporabljanih konjskih antidifteričnih in antitetaničnih serumov, ki jih proizvajalci (zaradi nevarnosti vsled njihove antigeničnosti) običajno obdelujejo s papaino hidrolizo (v kateri razgradijo fragment III). Preostali fragment I+II, ki ima sicer antitelesno aktivnost, se pretirano hitro izloči.

Možno je, da se papainski fragment III reabsorbira v ledvičnih tubulih (146). Brez dvoma so na ta fragment vezane "transmisijske" determinante, potrebne za prehod skozi tkiva

(vezava na kožo, prehod skozi placentarno bariero, eventualno skozi stene kapilar), ki varirajo od vrste do vrste (147,148).

Papainski fragment III je peptidna veriga, ki predstavlja del peptidnega člena A (glej shemo strukture gama globulina). Če je na eni strani ugotovljena korelacija med hitrostjo, s katero se eliminira intaktna molekula 7S gama globulina, ter eliminacijo ustreznega fragmenta III (pri raznih vrstah), lahko verjetno iščemo vzrok za razlike v katabolizmu humanih 7S in 19S antiteles prav v različni kemični sestavi in antigeni strukturi njunih peptidov A.

Malo prej omenjeno dejstvo , da se papainska fragmenta I+II izločata v urinu v svoji proteinski obliki , sovpađa s podatki, opisanimi na strani 15. Če namreč drži predpostavka, da se peptida A in B sintetizirata ločeno (v istih ali različnih celicah) in sta šele kasneje sestavljena v kompletno antitelesno molekulo, ni čudno, da organizem proizvede tudi v normalnem stanju prebitek člena B (ki ga najdemo v normalnih urinih), saj ta sestavlja del rapidno eliminiranega papainskega fragmenta I ali II in se le kratek čas zadržuje v cirkulaciji (potrjeno s Cohenovimi neobjavljenimi poskusi). V mielomatozah je ta sinteza izrazito asinhronična in vodi do sinteze pretiranih količin B člena (ali Bence Jones proteina).

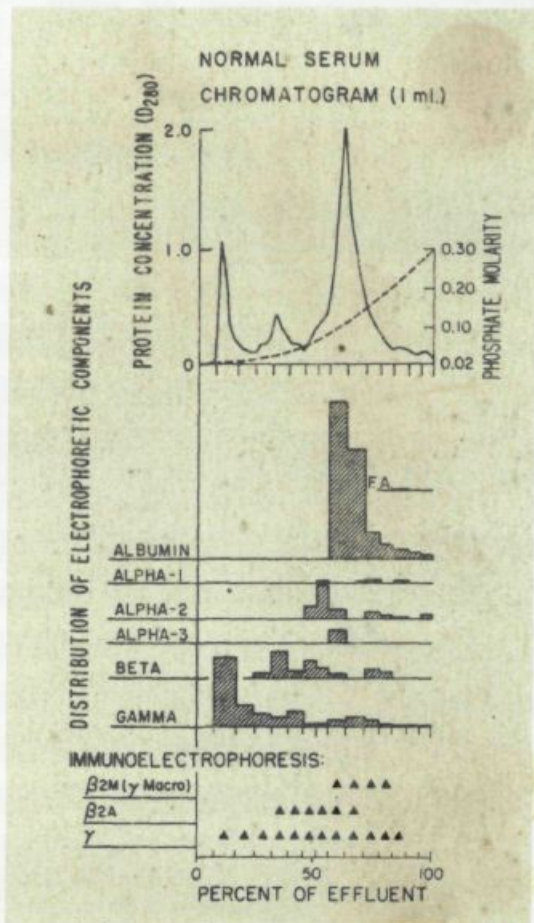
Pregled znanih preparativnih tehnik za izolacijo gama makroglobulina.

Prvi poskusi izolacije gama makroglobulina slonijo na dejstvu, da sodijo makroglobulini med serumske proteine z najvišjo molekularno maso. Centrifugiranje v visokem gravitacijskem polju, eventualno z dodatkom NaCl ali saharoze za zvisanje gostote, nam omogoči, da iz seruma izločimo frakcijo, ki je znatno obogatena z makroglobulini. (39) Nažalost pa ta sestoji iz mešanice alfa in gama makroglobulinov. Njihovo ločbo je mogoče izvesti s preparativno elektroforezo v primernih transportnih medijih, kot so celuloza (135), nizkomolekularni dekstranski gel (136) ali polivinilklorid (45, 137). Objavljene so metode, kjer je bilo s kombinacijo preparativnega ultracentrifugiranja in kolonske elektroforeze (oziroma frakcioniranja z alkoholom) dobiti precej čiste preparate makroglobulina (138, 139). Vendar so avtorji običajno uporabljali serume z visokimi koncentracijami patološkega makroglobulina, ki ga je bilo včasih vsled njegove slabe topnosti možno oboriti iz seruma že z razredčevanjem z destilirano vodo (5) ali 0,005 M fosfatnemu puferju (140). Dosti težje je izolirati iz seruma normalne makroglobuline, ki nastopajo le v koncentraciji okrog 1% celokupnih beljakovin.

Nove možnosti za izolacijo makroglobulina je odprla kromatografija na anionskem izmenjevalcu, DEAE celulozi (18, 12, 141, 142, 72).

Pri visokem pH in nizki jonski jakosti puferja veže ta izmenjevalec skoro vse serumske beljakovine, ki jih lahko nato stopnjevito ali pa v koncentracijskem in pH gradientu

eluiramo in pri tem dobimo distribucijski diagram, ki je v bistvu narobe obrnjena slika distribucije posameznih frakcij v elektroforezi. Edina izjema v tej korelaciji je gama makroglobulin. Le zaradi navidezno večjega elektrostatskega naboja, verjetno pa zaradi nespecifične adsorpcije vsled velikosti molekul, ga je mogoče zaslediti sele v zadnjih porcijah eluata.



Distribucija 7S gama, 19S gama in gama 1A normalnega humanega seruma na DEAE celulozi.

Gradient: 0,02 M fosfatni pufer pH 8,0 -
0,3 M fosfatni pufer pH 8,0

Po Faheyu (12), 1962.

Z rekromatografiranjem ustreznega eluata in kombinacijo raznih postopkov je bilo mogoče dobiti relativno čiste preparate gama makroglobulina.

Nove separacijske možnosti je dala uporaba "molekularnih sit" to je, prečno-vezanih dekstranskih gelov tipa Sephadex (Pharmacia Uppsala) (143).

Tako je mogoče mešanico proteinov, ki jo dobimo v zadnji fazi zgoraj omenjene kromatografije na DEAE celulozi, uspesno ločiti na gelu Sephadex G-200, kjer se v vodilnem (začetnem) vrhu pojavlja makroglobulin, komponente z manjšo molekularno maso (predvsem albumin) pa šele v naslednjih vrhovih. V tem primeru smo se že v teku kromatografije znebili alfa makroglobulina, ki bi tudi nastopil v prvem vrhu po separaciji na G-200, pač pa moramo računati s kontaminacijo alfa in beta lipoproteinov in haptoglobinov tipa 2-2. (lastna izkustva, Chaplin H.Jr.- neobjavljeni eksperimenti, 72).

Bistveno poenostavitev preparativne tehnike pri izolaciji gama makroglobulina pa je nastopila z uporabo naslednjega Pharmacia produkta - kombinacije dekstranskega gela G-50 in anionskega izmenjevalca DEAE, takozvanim Sephadex A-50. Na razpolago mi je bila kmalu nato, ko se je pojavila na tržišču. Že na prvi pogled so presenetile začetne porcije eluata s svojo opalescenco, ki je tipična za gama makroglobulin. Tega smo v prejšnjih eksperimentih z DEAE celulozo našli šele mnogo kasneje, kot že zgoraj omenjeno. Kmalu je postalo jasno, da gre tokrat za pravilnejši elucijski diagram, v katerem najdemo makroglobuline skupno s proteini, ki imajo približno isto izoelektrično točko.

Da bi raziskala pogoje, pod katerimi bi bilo mogoče z največjim izplenom eluirati gama makroglobulin, sem izvedla posebno serijo eksperimentov, o katerih poročam v naslednjem poglavju.

1. Opisne metode za določanje koncentracije
vsebnosti in izločitve s pomočjo kromatografije, opisane in
preizkušene na Sephadex A-50 in Filtrirali štovi na
Sephadex G-20.

Material in metode

Zaradi potrebe po določanju vsebnosti in izločitvi s pomočjo
kromatografije v laboratoriju, opisane in preizkušene v
eksperimentalni delu, so bili uporabljeni naslednji materiali in metode.

1. Priloga št. 1

E K S P E R I M E N T A L N I D E L

Priloga št. 1 opisuje metode za določanje vsebnosti in izločitve s
pomočjo kromatografije. Vsebnosti so določene v 0,15M
NaCl in 0,1M NaOH, pri čemer se uporabljajo različne
metode. Vsebnosti so določene s pomočjo kromatografije
na Sephadex A-50 in Filtrirali štovi na Sephadex G-20.
Vsebnosti so določene s pomočjo kromatografije na
Sephadex A-50 in Filtrirali štovi na Sephadex G-20.
Vsebnosti so določene s pomočjo kromatografije na
Sephadex A-50 in Filtrirali štovi na Sephadex G-20.

2. Priloga št. 2

Opisne metode za določanje vsebnosti in izločitve s pomočjo
kromatografije, opisane in preizkušene v eksperimentalni delu,
so bili uporabljeni naslednji materiali in metode. Vsebnosti
so določene s pomočjo kromatografije na Sephadex A-50
in Filtrirali štovi na Sephadex G-20. Vsebnosti so določene
s pomočjo kromatografije na Sephadex A-50 in Filtrirali štovi
na Sephadex G-20. Vsebnosti so določene s pomočjo
kromatografije na Sephadex A-50 in Filtrirali štovi na
Sephadex G-20.

1. Študij eksperimentalnih pogojev pri novi preparativni metodi za izolacijo gama makroglobulina, obstoječi iz kromatografije na Sephadex A-50 in filtraciji skozi gel Sephadex G- 200.

Material in metode

Zaradi potrebe po čimvečjem izplenu in čimvisji čistosti izoliranega makroglobulina sem izvedla naslednjo serijo eksperimentov v navedenem vrstnem redu:

1. Priprava euglobulina

Pul 1000 ml normalnega humanega seruma sem dva dni dializirala v tekoči vodovodni vodi pri $+4^{\circ}\text{C}$ in nato dva dni v dejonizirani vodi, ki sem jo večkrat menjala, tudi pri $+4^{\circ}\text{C}$.

Dobljeni precipitat (euglobulin) sem raztopila v 0,15M fosfatnem puferju, pH 7,5, ga razdelila v alikvote in jih posamezno dializirala (ekvilibrirala) s puferji naslednje molarnosti: 0,01 , 0,025, 0,05 , 0,1 , 0,15 .Z istimi puferji sem ekvilibrirala tudi enako število kolon, napolnjenih s Sephadexom A-50, z enotnimi dimenzijami 1,5 cm X 30 cm. PH puferja je bil povsod 7,5.

2. Kromatografija na A -50

Opisane porcije euglobulina sem filtrirala skozi kolone z odgovarjajočim pH, ekvilibrirane z ustreznim puferjem. Pretočna hitrost skozi kolone: 60 ml /uro. Kolone sem kvantitativno izprala z istim puferjem, ki sem ga uporabila tudi pri koncentriranju eluata z dializo pod pritiskom.

3. Filtracija skozi gel G-200

Vsakega od opisanih eluatov sem filtrirala skozi kolono, napolnjeno z gelom Sephadex G-200, ekvilibriranim z naslednjim puferjem: 0,1M TRIS + 0,2M NaCl (144). Dimenzije kolone: 3cm x 140 cm. Pretočna hitrost: 15 ml/uro.

Ekstinkcije E_{280} so razvidne iz diagramov.

Posebej sem filtrirala mešanico humanega krioglobulina, 7S gama globulina in albumina (umeritvena krivulja).

Navedene čiste frakcije mi je podaril Dr. S. Cohen, Wright-Fleming Inst., London.

Eluate prvih vrhov v poskusni seriji, ki so v celoti odgovarjali krioglobulinskemu vrhu umeritvene krivulje, sem dializirala pod pritiskom do volumnov okrog 1 ml, vsakokrat proti puferju, uporabljenem za opisano filtracijo.

R e z u l t a t i

1. Euglobulin

Iz 1000 ml normalnega humanega seruma je bilo mogoče oboriti in po nadaljni dializi obdržati v raztopini naslednjo količijo euglobulina (Biuret):

konc. = 38,6 mg/ml V = 60 ml Skupno 2316 mg

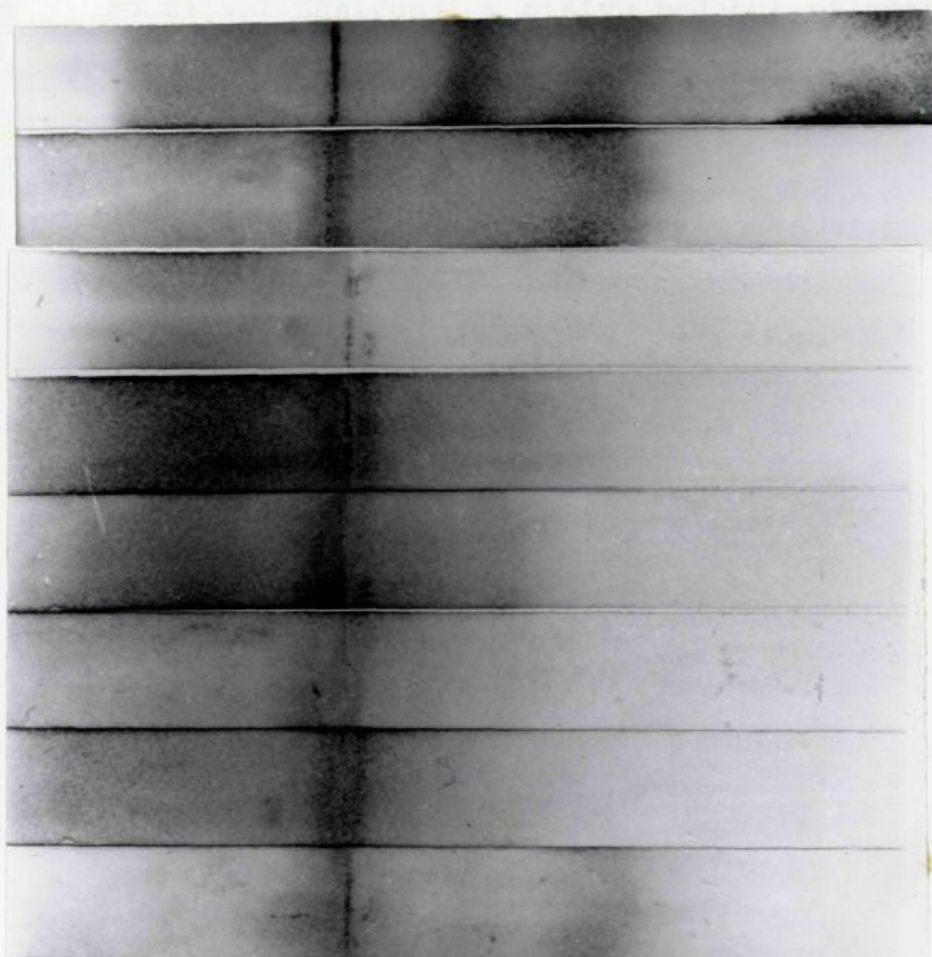
Za vsakega od eksperimentov v opisani seriji sem uporabila naslednje alikvote:

konc. = 38,6 mg/ml V = 6,0 ml Alikvot 230 mg

kar odgovarja 100 ml izhodnega seruma. Posamezne izplene lahko v bodoče izražamo direktno kot izplen /100 ml normalnega seruma.

Koncentracijo euglobulina sem ponovno merila po končani dializi proti puferjem različne molarnosti (Tabela).

Njegova analiza v papirni in imunoelektroforezi kaže mešanico raznih globulinov z elektroforetsko gibljivostjo v predelu gama, beta in alfa globulinov in sledjo albumina.



Sl.1.

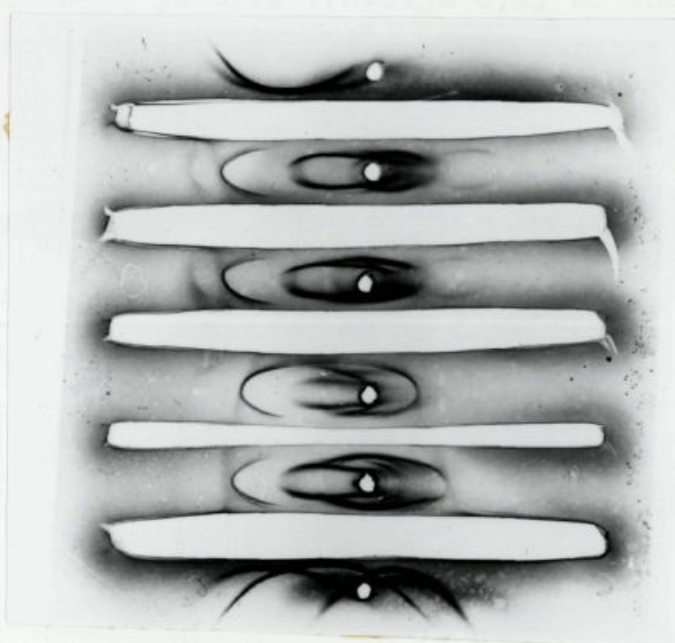
Papirna elektroforeza naslednjih frakcij (od zgoraj navzdol)
 Normalni humani serum, euglobulin; nato frakcije, dobljene s
 kromatografijo na A-50, v naslednjem vrstnem redu: 0,05 M -
 0,025 M - 0,05 M - 0,075 M - 0,1 M - - 0,15 M.

2. Kromatografija na A-50

Posamezni izpleni kromatografije na A-50 so razvidni iz tabele (B), prav tako njihova elektroforetska sestava, ocenjena na podlagi papirne in imunoelktroforeze (Sl. 1 in 2).

Razen eluata, ki kaže le dvojno črto 7S gama globulina, so si vsi naslednji v bistvu podobni po svoji sestavi, le da kažejo kvantitativno naraščanje eluiranih proteinov.

V eluatu 0,15 M je v papirni (verjetno tudi v imuno) elektroforezi videti novo frakcijo v predeli alfa-2, ki je pri nižjih molarnostih ni opaziti. Povsod je dobro vidna crta gama makroglobulina (verjetno raztopljen v njegovem prebitku v 0,15 M eluatu).



Sl.2.

Imunoelektroforetska analiza kromatografskih frakcij po filtraciji skozi Sephadex A-50.

Eluati od zgoraj navzdol: 0,01M - 0,025M - 0,05M - 0,075M - 0,1M - 0,15M.

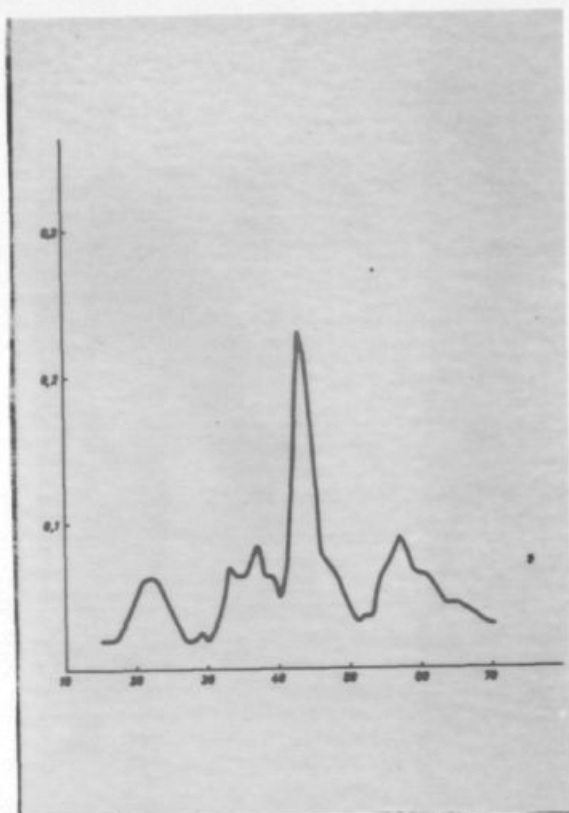
3. Filtracija na G-200

Sl. 3- 9 predstavljajo posamezne elucijske diagrame, dobljene s filtracijo na gelu G-200. Vsi kažejo med sabo veliko podobnost, le da se menjajo kvantitativna razmerja med posameznimi komponentami. Prvi vrhovi odgovarjajo makroglobulinskemu vrhu v umeritveni krivulji. Njihovi izpleni v posameznih ločbah so razvidni iz Tabele (D). Koncentracijo proteinov sem določala le na podlagi ekstinkcije E_{280} in Biuretske metode. Vsaka od vrednosti v tabeli (D) odgovarja absolutnemu izplenu makroglobulina v 100 ml izhodne plazme.

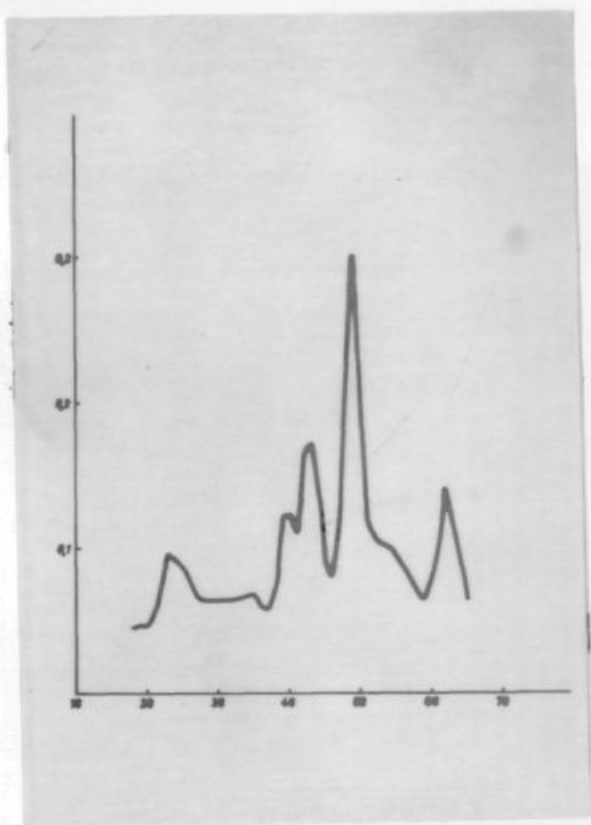
Frakcije od 0,025M do 0,1M sem analizirala v imunoelektroforezi. Dale so eno samo, za makroglobulin tipicno crto, medtem ko je bila frakcija 0,15 že onečiščena s komponentami v predelu beta in alfa globulinov.

Molarnost puferja A-50 krom	A Euglob. v raztopini	B Izplen A- 50	C Komponente (p.elf.)	D Izplen G -200
	mg	mg		mg
0,01 M	178,6	23,0	gama-	
0,025 M	188,0	32,4	gama+beta	3,8
0,05 M	226,0	50,7	gama+beta	7,3
0,075M	232,0	46,0	gama+beta	5,9
0,1 M	216,0	53,0	gama+beta	6,0
0,15M	213,0	105,0	gama+beta+alfa ₂	5,9

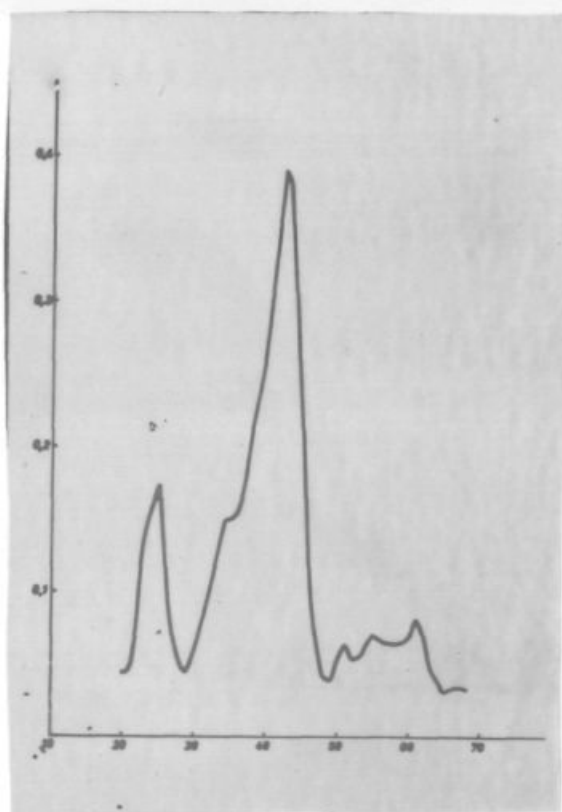
Tabelaricen prikaz posameznih izplenov v teku ekvilibriranja euglobulina proti puferjem razne molarnosti, kromatografije na Sephadex A-50 in filtracije skozi gel Sephadex G-200.



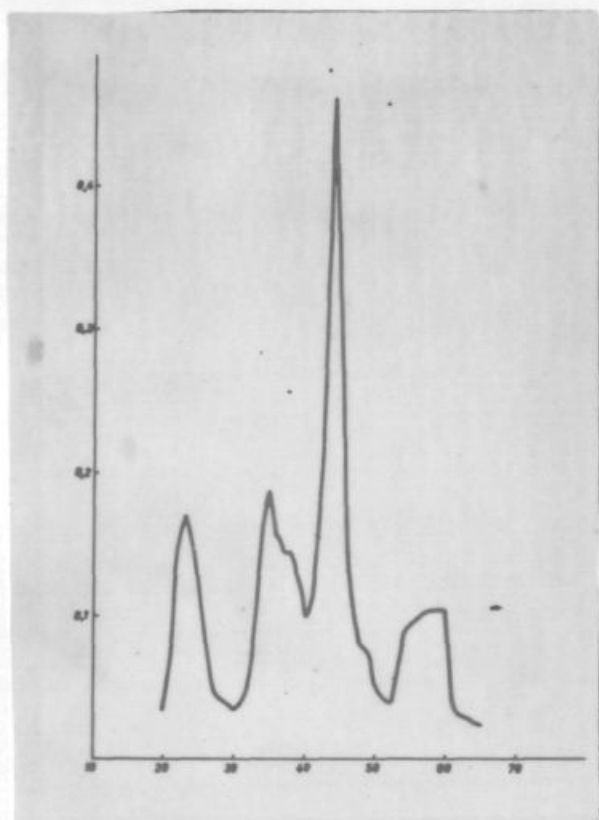
G-200 : 0,025M



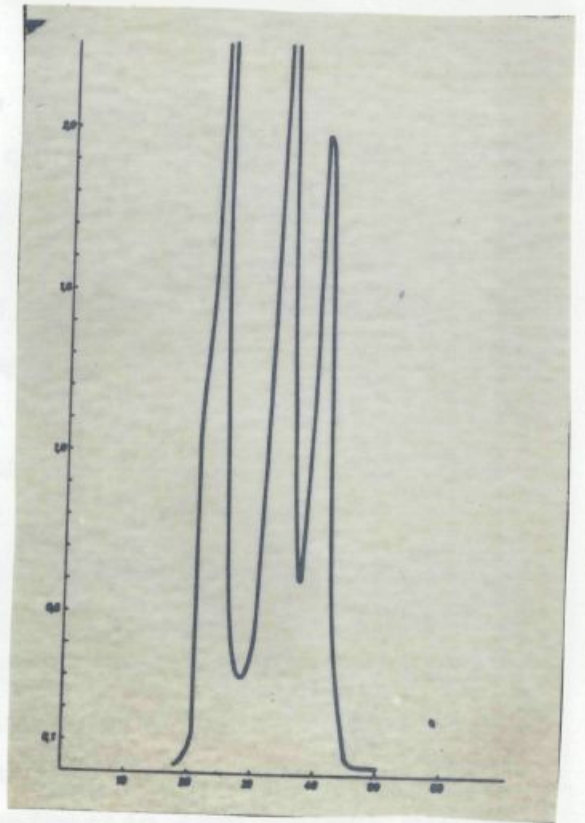
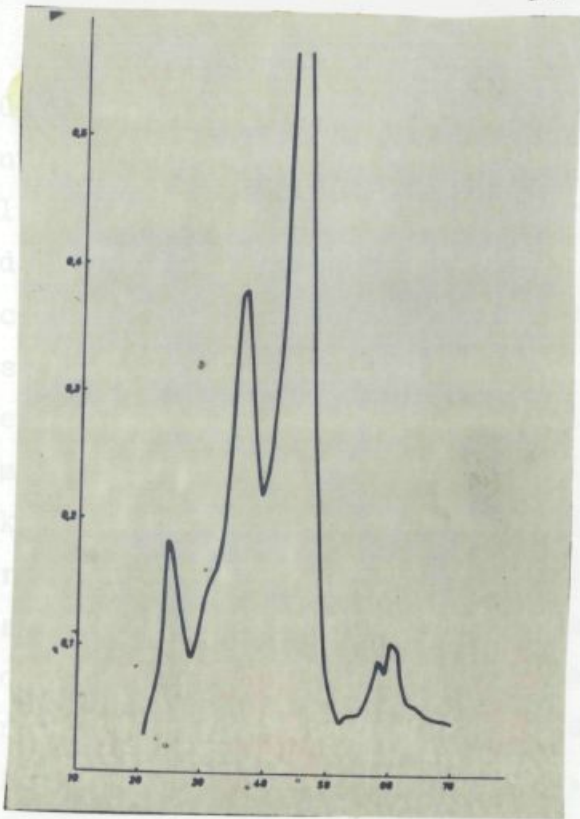
G-200 : 0,05M



G-200 : 0,075M



G-200 : 0,1M



G-200 : 0,15 M

G-200 : Umeritvena krivulja

D i s k u s i j a

Opisana serija eksperimentov me je utdila v prepričanju, da nudi uporaba novega Sephadex A-50 odlične prednosti pri izolaciji normalnega humanega makroglobulina v primeri z dose-
daj uporabljano DEAE celulozo. Uporaba nezveznega koncentracijskega gradienta z razponom od 0,01 M do 0,15 M pri konstantnem pH 7.5 daje elucijski diagram, ki je narobe obrnjena elektroforetska slika euglobulina, pri čemer eluiramo gama makroglobulin skupno z ostalimi gama in beta antitelesi, med katere sodi po svoji izoelektrični točki. Od njih ga je relativno lahko izolirati v filtraciji skozi gel G-200, če se izognemo navzočnosti alfa makroglobulina (molarnosti nižje od 0,1). Nezadovoljiv je seveda izplen makroglobulina, kar je najbrž pogojeno z relativno visokim pH elucijskih sistemov v kromatografiji, z ozirom na to, da je bila koncentracija soli v primeri s Faheyveo finalno koncentracijo (pri kateri eluira makroglobulin), vendarle nizka, in pa na dejstvo, da makroglobulini močno varirajo v svojih izoelektričnih točkah (44) v pH intervalu med 5,1 - 7,7.

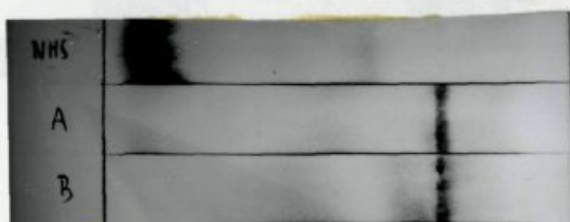
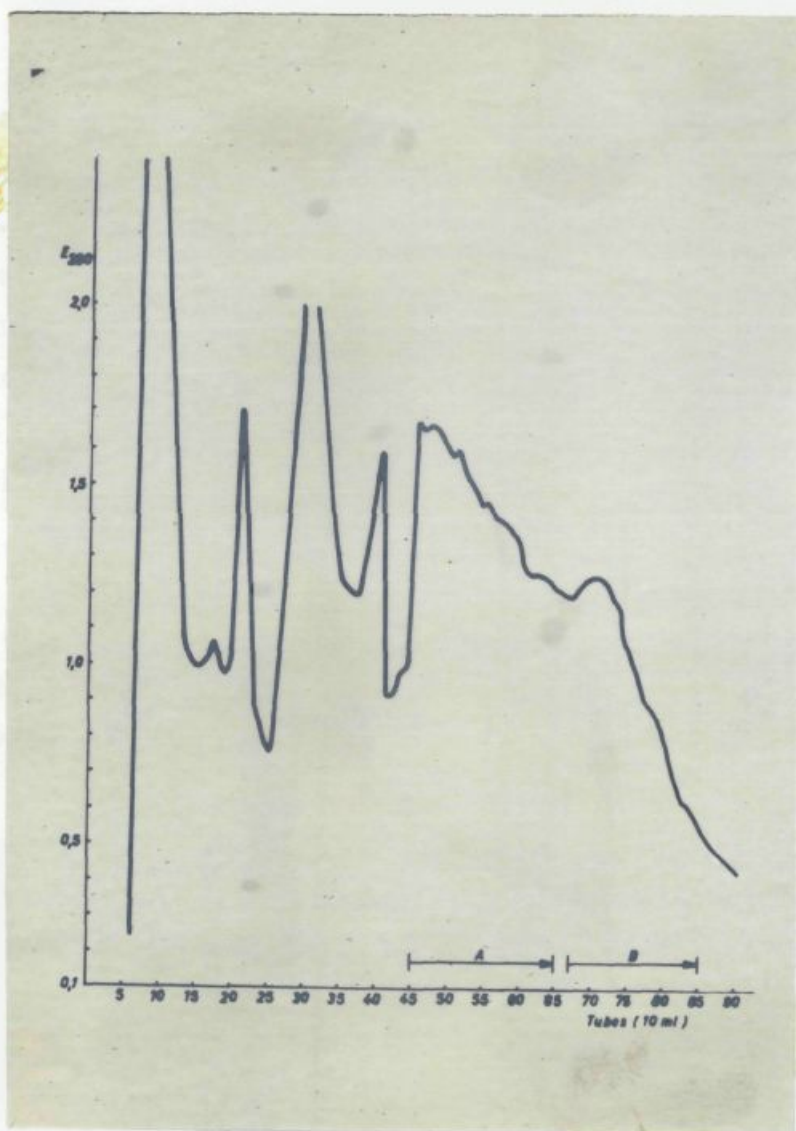
Nadaljnji, manj sistematski eksperimenti z variranjem obeh parametrov (pH in koncentracije soli v puferju), so pokazali, da lahko zvišamo izkoristek, ne da bi trpela čistost makroglobulina, če kromatografiramo euglobulin pri pH 6.0 v 0,1 M fosfatnem puferju in dobljeno frakcijo filtriramo skozi G-200. To metodo sem uporabila pri pripravi makroglobulina za metaboličen poskus T-3 v zajcu ter vseh poskusih na človeku, ki so opisani kasneje. Cohen je iste pogoje uporabil za svoje eksperimente in jih po mojem odhodu iz Londona samostojno objavil (72). Sodim, da predstavlja opisana kombinacija postopkov relativno mil način za pripravo makroglobulina, ki ga uporabljamo v metaboličnih poskusih.

2. Priprava normalnega humanega gama makroglobulina za
metabolicne poskuse.

A. KROMATOGRAFIJA NA DEAE CELULOZI IN FILTRACIJA
SKOZI GEL SEPHADEX G- 200. (T-1).

200 ml normalnega gambijskega seruma * s haptoglobinskim tipom 1-1 sem destilirala proti dvajsetkratni količini dejonizirane vode (še prej pa 2 dni proti tekoči vodovodni vodi) v hlajenem prostoru na +4°C. Dobljeni euglobulin (1700 mg) sem najprej raztopila v 0,1 M fosfatnem puferju, pH 7,0, nato pa z dializo ekvilibrirala z 0,02 M fosfatnim puferjem, pH 8,0. Le 1500 mg euglobulina je ostalo v raztopini. Nanesla sem ga na predhodno odgovarjajoče ekvilibrirano kolono, napolnjeno z DEAE celulozo (3 cm x 50 cm) in ga eluirala v koncentracijskem in pH gradientu (0,02 M fosfat, pH 8,0 --- 0,3 M fosfat, pH 5,0) preko mešalne komore z volumnom 500 ml. Pretočna hitrost: 15 ml/uro. Zbirala 10 ml porcije eluata z avtomatičnim frakcijskim kolektorjem (glej diagram na prihodnji strani). Zadnji vrh sem razbila v dve ločeni porciji (A in B) ter ju koncentrirala z uporabo pozitivnega pritiska v dializirni cevi proti 0,1 M fosfatnem puferju, pH 8,0. Papirna elektroforeza obeh frakcij kaže, da se v začetnem delu krivulje eluira tudi albumin, ki ga v drugem delu ni več videti, da pa sicer predstavljata obe frakciji dve zelo podobni proteinski mešanici. Analiza sedimentacijskih konstant v ultracentrifugi je pokazala naslednjo sestavo (brez korekcije):

*serum afriških črncev iz Gambije, iz katerega smo na Wright-Fleming Inst. izolirali hiperimuni anti-malarični gama globulin.



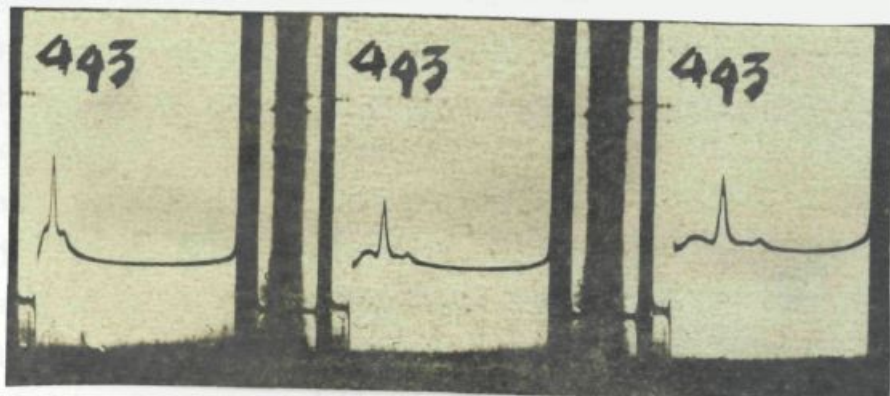
Kromatografija euglobulina, pripravljenega iz normalnega humanega seruma, na DEAE celulozi. Abscisa: kolicina eluata, ordinata: ekstinkcije pri 280um.

Papirna elektroforeza frakcije A in B.

Mešanica A : 3,5S (albumin) in 15,67S (makroglobulin)

Mešanica B : 1,71S, 6,75S (gama globulin) in 15,67 S

Z ozirom na to, da albumin ne moti pri nadaljnji separaciji v molekularnem situ G-200, sem obe porčiji združila. Celokupna količina beljakovin v tej mešanici je znašala 350 mg (Biuret). Filtracija skozi kolono G-200 (3cm x 100 cm), ki je potekala s pretočno hitrostjo 10-15 ml /uro, je dala tri vrhove, od katerih prvi odgovarja makroglobulinskemu vrhu v umeritveni krivulji in je znašal 65 mg. Uporabljeni pufer: 0,2 M acetatni pufer + 0,2 M NaCl, pH 5,1. Raztopina 10 mg/ml je dala v analitski ultracentrifugi naslednjo distribucijo:



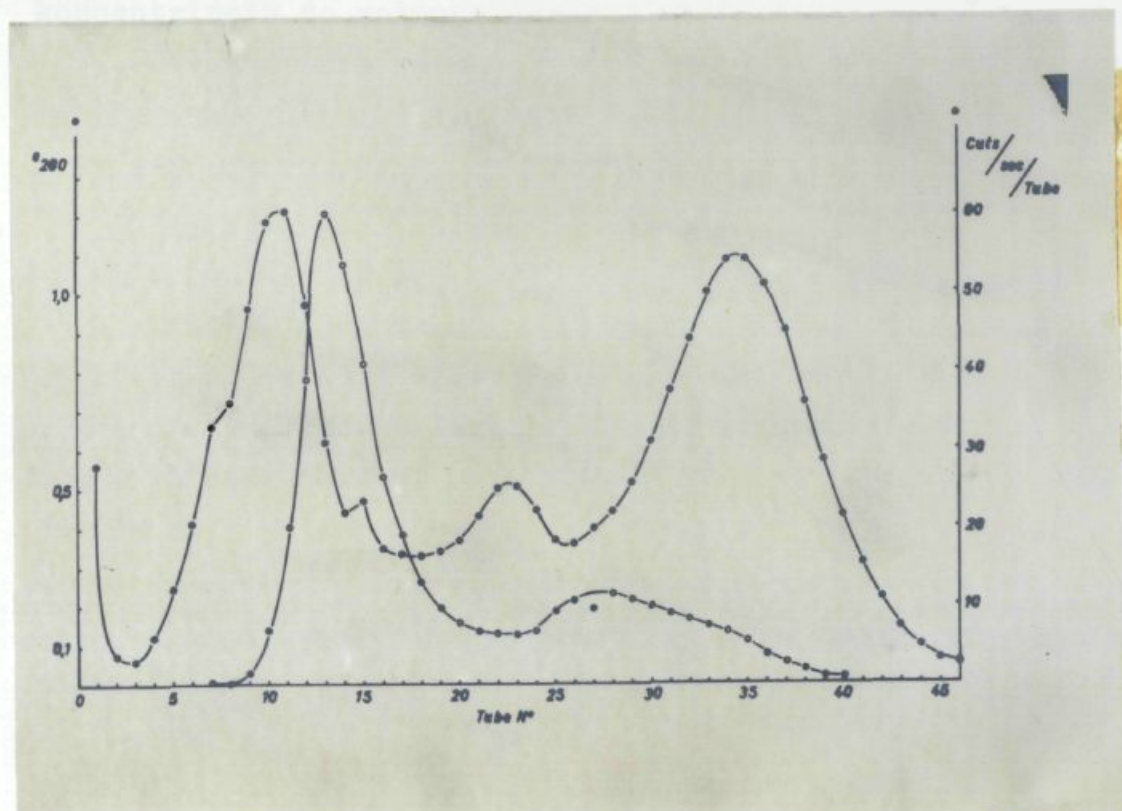
Vidimo tri vrhove s sedimentacijskimi konstantami 10S, 16S in 28S v procentualnem razmerju 12%, 65% in 22% (Dr. R.H. Pain, Wright-Fleming Institut, London). Elektroforska ločba v škrobnem gelu pokaže komponento z gibljivostjo beta globulinov, medtem ko makroglobulin sploh ne prodre v gel.

B. FILTRACIJA NA GELU G- 200 IN ELEKTROFOREZA
NA G- 25 KOT NOSILNEM MEDIJU. (T-2).

T-2/2

7 ml svežega seruma (krvna grupa AB) sem čez noč (17 ur) centrifugirala v 45% glukozi (40,000 rot./min, T +4°C, MSE Superspeed 40 centrifuga), da bi odstranila lažje lipoproteine. Spodnjo plast, približno 5 ml, sem porabila za nadaljno separacijo. (plastično centrifugirno cevčico sem na dnu preluknjala in postopoma lovila raztopino, kot je odtekala).

Kolona Sephadex G-200 (3cm x 100 cm) v 0,2M TRISu, pH8,1 je imela pretočno hitrost 10 ml/h. S filtracijo spodnje plasti centrifugiranega seruma sem dobila v elucijskem diagramu vodilni vrh, sestavljen iz mešanice alfa in gama makroglobulinov, ki sem ga koncentrirala z dializo pod pritiskom. Dobljeno količino (pribl. 4 mg beljakovin) sem markirala z radioaktivnim jodom ^{131}J , ki je bil inkorporiran s celokupno aktivnostjo 104 uC (Metoda markiranja - glej v prihodnjem poglavju). Markirana frakcija sem dodala 3 ml normalnega zajčjega seruma in vse skupaj čez noč dializirala proti naslednjemu pufferju, ki sem ga uporabila za elektroforezo na koloni :0,1M TRIS, 0,004M EDTA, 0,0015 M borna kislina, pH 8,1 (136). Kot nosilni medij v preparativni elektroforetski ločbi je služil Sephadex G-25 (coarse). Dimenzije kolone: 6 cm x 60 cm. Start v sredini. Elektroforeza: 600 V, 14 mA, 65 ur. Hlajenje z vodnim plaščem (+10°C). Elucija z istim pufferjem v 10 ml porcijah. Iz diagrama je razvidna distribucija radioaktivnosti vzdolž kolone (vsaka porcija eluata je bila posebej merjena v Ring- counterju), istočasno pa jo je mogoče primerjati z distribucijo UV- ekstinkcij, ki je razvidna iz slike (zaj.s.)



Elektroforetska ločba prvega vrha iz G-200 (mešanice alfa in gama makroglobulinov) na G-25 kot nosilnem mediju.

o-o-o- Radioaktivnost 10 ml porcij eluata

o-o-o- UV ekstinkcije istočasno ločenega zajčjega seruma, ki smo ga dodali pred začetkom elektroforeze.

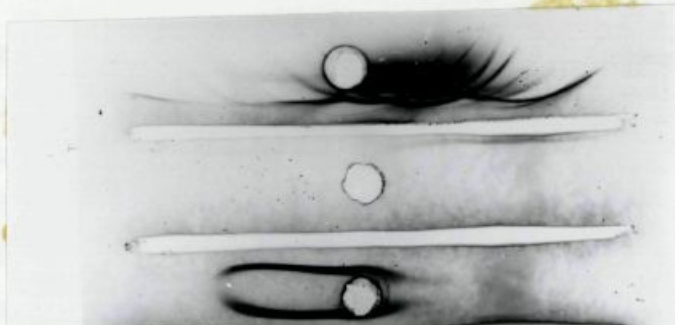
Radioaktivnost je bila izplenjena s 85% in razporejena v dva različno velika vrha, od katerih odgovarja prvi alfa makroglobulinu, drugi pa gama makroglobulinu. Vsakega zase sem koncentrirala do volumna okrog 2 ml in takoj pomešala z zajčjim serumom, da bi preprečila eventualno denaturacijo vsled velike specifične aktivnosti (Alfa makroglobulin 5 uC /2ml, gama makroglobulin 52 uC /2ml)

T-2 /0 in T-2 /1

Opisani postopek sem dvakrat ponovila z normalnim gambijskim serumom. Za razliko od preparacije T-2/?/ sem dobila nekoliko drugačno distribucijo radioaktivnosti v teku elektroforeze. Za razliko od zgoraj opisane distribucije, v kateri odpade na gama makroglobulin le 8% izpljenjene radioaktivnosti, je ta vrednost dosti višja, če sem uporabila serum gambijskih črncev (20%). To ne preseneča, saj je znano, da razpolagajo prebivalci predelov z endemico malarijo z znatno višjimi koncentracijami antiteles (116).

C. KROMATOGRAFIJA NA SEPHADEX A-50 IN FILTRACIJA
SKOZI SEPHADEX G- 200.

1000 ml normalnega serumskega pula* sem 5 dni dializirala proti 20 kratni količini dejonizirane vode pri $+4^{\circ}\text{C}$. Dobljeni euglobulin sem večkrat izprala z ledenomrzlo vodo in ga nato raztopila v 0,1 M fosfatnem puferju, pH 6,0. Z istim puferjem sem ekvilibrirala kolono, napolnjeno z anionskim izmenjevalcem, Sephadex A- 50 . Dimenzije kolone: 3,5 cm x 38,0 cm . Proteinska mešanica je tekla skozi kolono s hitrostjo 20 ml/uro. Količina nanesenega euglobulina je znašala 2800 mg. Eluat. sem zbirala v večjih porcijah toliko časa, da je UV ekstinkcija padla pod 0,1, ter ga nato koncentrirala pod pritiskom in istočasno dializo do volumna 120 ml. Celokupna količina beljakovin je znašala 1400 mg (Kjeldahl). S tretino te količine sem izvedla separacijo na gelu Sephadex G- 200, ki je dala tri vodilne vrhove. Koncentrirala sem prvi vrh, (Uporabljala sem naslednji pufer: 0,1 M TRIS, 0,2 M NaCl, pH 8,0.) , ki je v papirni elektroforezi pokazal giblјivost hitrih gama globulinov ter dal v imunoelektroforetskem preparatu za makroglobulin tipicno linijo. Izplen : 25 mg makroglobulina /100 ml seruma.



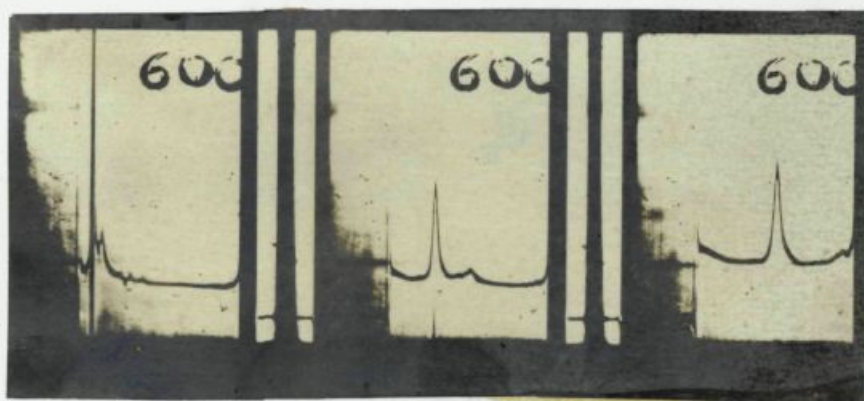
Imunoelektroforetska analiza gama makroglobulina, pripravljene s kromatografijo na A-50 v 0,1M fosfatnem puferju ter filtracijo skozi Sephadex G-200.

Konjski antihumani serum (Institut Pasteur, Paris)

*) defibriniranega plazmatskega pula, starega nekaj dni.

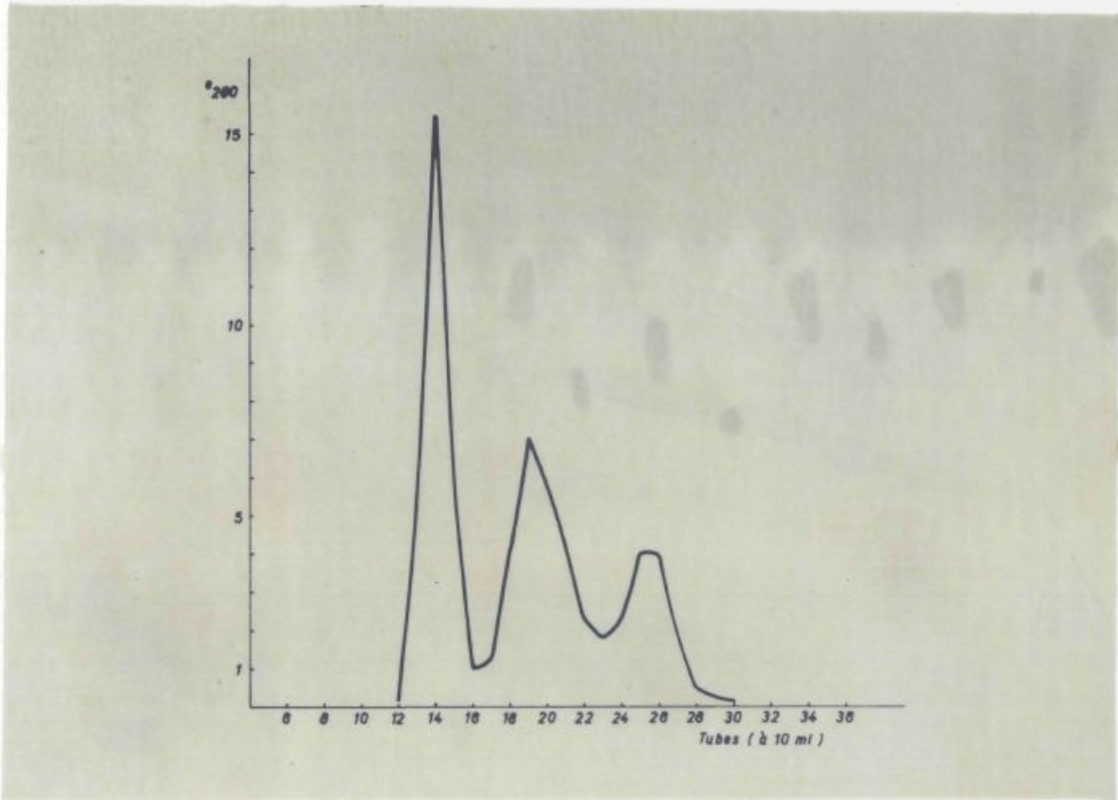
Ta je pokazal tudi eno samo precipitacijsko črto v imunodifuzijskem testu z antiserumom (anti-humanim konjskim serumom, Pasteur Institut, Paris), ki sem ga predhodno absorbirala s humanim 7S gama globulinom in ki v tem ni več reagiral.

Analiza v analitski ultracentrifugi je dala naslednje podatke:

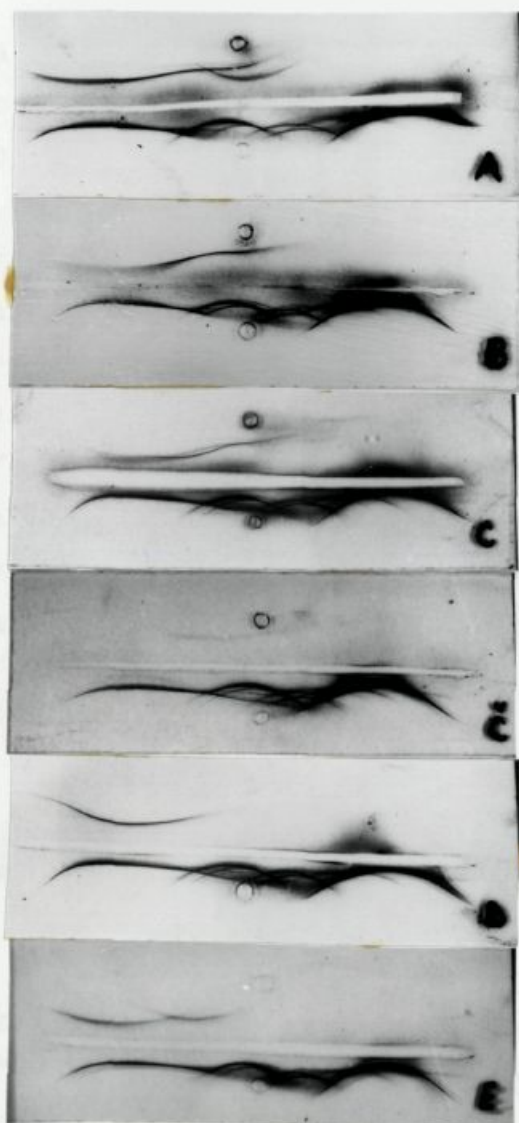


Makroglobulinska frakcija vsebuje dve komponenti s sedimentacijskima konstantama 17S in 30S v razmerju 90% in 10%. (Dr. R.H. Pain, Wright-Fleming Institut, London)

Istocasno sem iz 500 ml plazmatskega pula pripravila frakcijo čistega 7 S gama globulina. Kolona Sephadex A-50 in serum sta bila ekvilibrirana z 0,01 M fosfatnim puferjem, pH 7,0. Dimenzije kolone: 2cm x 30 cm. Pretočna hitrost nekontrolirana. Kolono sem kvantitativno izprala z istim puferjem in eluat koncentrirala pod pritiskom ob istočasni dializi proti 0,1M fosfatnem puferju, pH 8,0. Izplen je znašal 300 mg 7S gama globulina /100 ml seruma.



Filtracija na gelu G-200 frakcije, ki smo jo dobili s kromatografijo na A-50 (0,1M fosfatni pufer, pH 6,0).
 Pufer pri filtraciji skozi G-200 : 0,1M TRIS, 0,2M NaCl, pH 8,0.

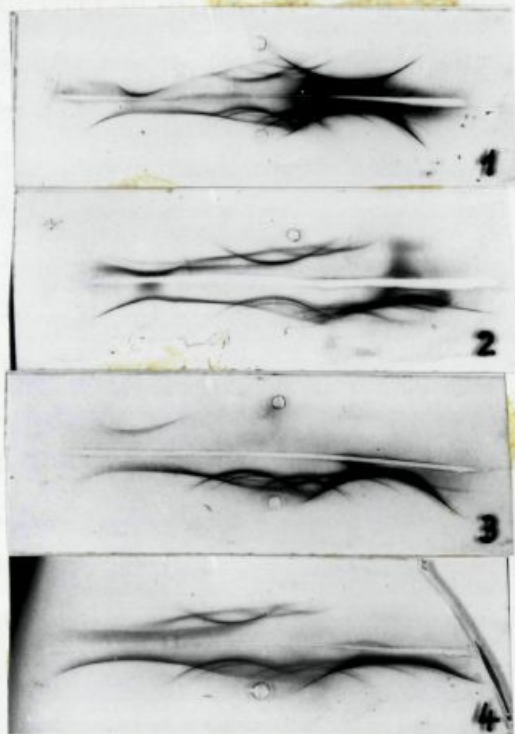


Imunoelektroforetske slike raznih frakcij v teku kromatografije na A-50 in filtracije na gelu G-200.

Od zgoraj navzdol: A) zgoraj euglobulin, spodaj pseudoglobulin ; B) 0,015 M eluat- A-50 ; C) 0,1 M eluat- A-50 ; D) prvi vrh -G-200 (zelo razredcen); E) drugi vrh -G-200; E) tretji vrh - G-200.

Končno sem na analogen način izolirala iz seruma bolnika z gama plazmocitomom (Onkološki inštitut v Ljubljani - dr.M. Erjavec) gama paraprotein. To je bil na žalost edini primer paraproteinemije, ki je bil v času, ko sem vrsila eksperimente, dostopen.

Na isti koloni, uporabljeni za kromatografijo 7S gama globulina, sem pripravila (s predhodnim ekvilibriranjem izmenjevalnega gela in bolnikovega seruma) 0,1 M eluat (fosfatni pufer, pH 6,0), iz katerega sem oborila paraprotein z dializo proti 0,01M fosfatnemu puferju, pH 7,0. Precipitat sem večkrat oprala v ledenohladni dejonizirani vodi in ga nato raztopila v fiziološki raztopini NaCl.



Od zgoraj navzdol:

- 1) mielomski serum
- 2) 0,1M eluat -A-50
- 3) Ppt po dializi z
0,01 M fosf.puferjem
- 4) beljakovine ostale v
raztopini

3. Bioloski eksperimenti

A. M A T E R I A L I N M E T O D E

Material

Za poskuse, opisane pod T-1, T-2 in T-3 sem uporabljala po 10mg humanega ^{131}J gama makroglobulina, ki sem ga pripravila na razne načine, opisane v poglavju Priprava normalnega gama makroglobulina. Vsaka metoda nosi oznako eksperimenta, za katerega sem dobljeni makroglobulin pripravila. Metoda radiojodiniranja je opisana kasneje. Za poskuse na človeku sem uporabila po 20 mg makroglobulina, pripravljenega po metodi T-3. Povsod sem skrbela za to, da sem biološki eksperiment začela takoj po končanem pridobivanju in neposredno po tem, ko sem izvršila markiranje z ^{131}J .

Živalske eksperimente sem izvršila na hlevskih zajcih, katerim sem tri dni pred pričetkom dajala pitno vodo, ki je vsebovala 100 mg NaJ /100 ml (blokiranje ščitnice). Zajci, uporabljeni za poskuse T-1 in T-2 so bili imunotolerantni do gama makroglobulina. Takoj ob rojstvu so namreč dobili intraperitonealno injekcijo 10-15 mg humanega makroglobulina, kateri je po 8 dneh sledila še ena s približno 20 mg. Zajci v poskusu T-3, kot tudi tista dva, uporabljena za inokulacijo 7S in mielomskega gama globulina, niso bili tolerantni.

Objekti humanih eksperimentov so bili bolniki Onkološkega instituta v Ljubljani (dr.M.Erjavec), ki so po klinični presoji pokazali normalno funkcijo jeter. Pri vseh je bila pred pričetkom eksperimenta ščitnica blokirana z lugolom. (124)

Metode

Inokulacije zajcev sem izvedla sama, tako, da sem jih vbrizgala v ušesno marginalno veno testirano beljakovinsko raztopino, ki je bila vsakokrat pred aplikacijo sterilno filtrirana. Prvi vzorec krvi sem iz iste vene odvzela po 5-10 minutah po inokulaciji in nato vsakokrat, kot je to razvidno iz časovne lestvice.

Inokulacije in punkcije sterilno filtriranega materiala je pri ljudeh izvedel Onkološki institut v Ljubljani.

Meritve radioaktivnosti v raztopinah in krvnih vzorcih sem izvedla v scintilacijskem števcu z well-typ NaJ kristalom pri širini kanala 9V po ustaljenih umerjenih metodah Wright-Fleming Instituta ali Onkološkega Instituta. V longitudinalnih študijah je bila specifična aktivnost vzorcev vedno korigirana z ozirom na radioaktivni razpad. Vsakokrat sem merila 2 ml vzorce plazme, ki sem jih dobila s centrifugiranjem krvi, ki ji je bila predhodno dodana manjša količina heparina v prahu. Prva meritev po 5-10 minutah predstavlja v vseh primerih empirično vrednost 100%. Vse naslednje vrednosti so izražene v % te vrednosti.

Pri zajcih T-3, 7S in mieloma gama (sl.1) in pri pacientih S.T. in P.L. smo merili tudi celotno telesno aktivnost, oziroma aktivnost nad temenom in jetri - obakrat z umerjenimi kolimiranimi detektorji Onkološkega instituta v Ljublj. Prav tako je bila pri istih dveh bolnikih izvršena serija profilnih meritev vzdolž telesa s slot-kolimatorjem istega instituta.

V primeru bolnikov S.T. in P.L. sem v vseh odvzetih plazmatskih vzorcih med 5 minutami in 15 urami določala razmerje med proteinsko in neproteinsko vezano radioaktivnostjo.

V treh ml plazme sem najprej merila celokupno radioaktivnost, nato pa sem celotno količino plazme oborila z enakim volumnom triklorocetne kisline (10%), precipitat odcentrifugirala, dvakrat sprala z ledenohladno dejonizirano vodo, razredčila z 0,1N NaOH do prvotnega volumna 3ml in ponovno merila radioaktivnost.

V primeru S.K. sem 5minutni in 100 minutni vzorec plazme analizirala s filtracijo na gelu G-200. V prvem primeru sem nanese na kolono 3 ml, v drugem 15 ml plazme. Eluat sem zbirala v 10 ml porcijah. Distribucija radioaktivnosti je razvidna iz diagrama (ordinata: specifična aktivnost v 10ml eluata/G-200, abscisa: ml eluata). Uporabila sem kolono iste dimenzije in isti puferški sistem kot v metodi T-3. Pri vseh meritvah je bila upoštevana korekcija za razpad, ki se je izvršil v času po vrednotenju 5 minutnega vzorca, kot tudi za razlike v volumnih plazme, nanesenih na kolono. Tako sta obe krivulji absolutno primerljivi.

Markiranje z ^{131}J .

V poskusih T-1 in T-2 sem uporabljala radiojod angleške, v vseh naslednjih pa francoske provenienca.*

Držala sem se metode radioaktivnega markiranja po Mc Farlane-u (149) z vsemi predpisi in kriteriji. Inkorporacija joda je bila med 50-60% uporabljene aktivnosti, neproteinska aktivnost je znašala manj kot 1% inkorporirane vrednosti.

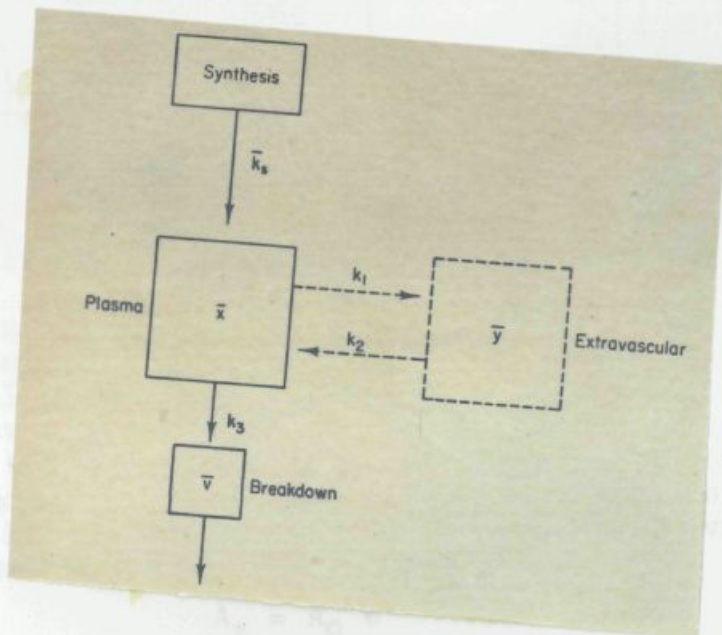
Totalna radioaktivnost v dozah, ki so jih sprejeli zajci, se je gibala med 5-30 mikrokiriji, pri ljudeh od 50-100 mikro C. . .Volumen vbrizganih radioaktivnih beljakovin je znašal povsod 1,5-2,5 ml.

V vseh diagramih je na ordinati naneseena specifična aktiv. vzorcev kot število impulzov/sekundo/volumen .

(* v 0,1N NaOH brez prisotnosti reducirajočih snovi)

B. Vrednotenje eliminacijskih krivulj

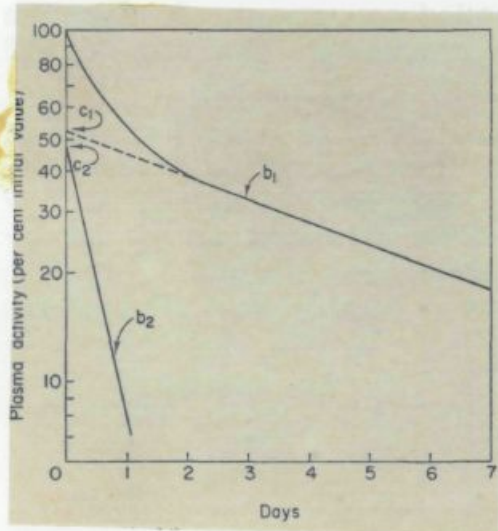
Če po tem, ko smo poskusni živali ali človeku vbrizgali radioaktivno beljakovino, v določenih časovnih presledkih merimo specifično aktivnost krvi (oz. plazme) ter to izrazimo v % začetne (to je, 5 minutne vrednosti) dobimo krivulje, specifične za določen eksperimentalni sistem. Sterling (150) je predložil eksperimentalni model, po katerem si lahko katabolično dogajanje, oziroma njegove posamezne faze, razlagamo na podlagi poznanih mehanizmov.



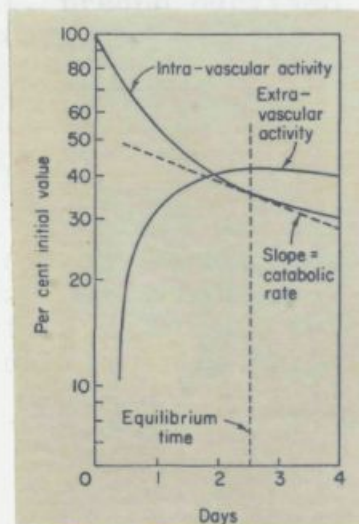
Slika 1

Nasplošno je za vse raziskane frakcije ugotovljeno, da se razgrajujejo v smislu eksponentielne funkcije prve stopnje. Iz slike 1 je razvidno kompleksno dogajanje pri obstoju vsake posamezne beljakovinske frakcije v organizmu. Ker so koncentracije beljakovin v plazmi zdravega človeka ponavadi konstantne, predpostavljamo, da so si posamezni procesi med seboj v dinamičnem ravnotežju (x = koncentracija beljakovine v plazmi, Y = koncentracija v ekstravaskularnem prostoru, v = količina beljakovin, ki reagira s proteolitskimi encimi na mestu razgradnje, k = konstante, ki povedo, koliko beljakovin prehaja iz enega prostora v drugega)

Vsak hip določen procent zapusti cirkulacijo in difundira v ekstracelularni prostor; prav tako se določen procent skozi limfatični sistem (ductus thoracicus) vrne v kri.



Slika 2



Slika 3

Če vrednosti specifične krvne aktivnosti naneseemo v semi-logaritmčni sistem, vidimo, da so sestavljene iz dveh delov. Prvi del krivulje je ukrivljen in reprezentira začetno izenačitev radioaktivnih molekul z ekstravaskularnim prostorom. To traja v večini primerov 36-72 ur. Potem času se krivulja podaljša v premico, ki karakterizira dejanski katabolizem, ko sta oba procesa že v dinamičnem ravnotežju. Tu se proces odvija po naslednjem izrazu:

$$A_t = A_0 e^{-k_1 t}$$

pri čemer je A_0 koncentracija v času 0, A_t koncentracija v času t in k_1 konstanta eliminacije.

Hitrost kataboličnega procesa običajno izrazamo s takozvanim kataboličnim razpolovnim časom $T/2$, ki ga lahko ali direktno odčitamo iz krivulje, ali pa izračunamo iz zgornjega izraza:

$$k_1 = \frac{\log A_0 - \log A_t}{t}$$

$$A_t = 1/2 A_0$$

Slika 2 kaže, kako lahko grafično razrešimo dvofazni sistem komponent, ki se različno hitro katabolizirata. To velja tudi za začetni del vsake eliminacijske krivulje, če imamo opraviti z delom beljakovin, ki je denaturiran in se rapidno izloči takoj po inokulaciji.

Na drugi strani pa lahko iz razlik celotne telesne aktivnosti in intravaskularne aktivnosti izračunamo ekstravaskularno aktivnost (slika 3). Če v točki, ko ta doseže maksimum, potegnemo tangento na krivuljo intravaskularne aktivnosti, lahko z ekstrapolacijo dobimo točko na ordinati, ki pokaže razmerje med intravaskularnim in ekstravaskularnim pulom markiranih molekul. To moramo vsekakor storiti, predno odčitamo $T/2$ na podlagi eliminacijske krivulje.

Navedena funkcija velja seveda le, če renalna eliminacija prostega jodida dohiteva degradacijo beljakovin. Za večino serumskih beljakovin to ne igra posebne vloge, vendar pa bi utegnilo modificirati rezultate pri eliminaciji denaturiranih agregatov ali eventualno gama makroglobulina, čigar razpolovni čas znaša v mojih eksperimentih približno toliko, kot je znano, da je razpolovni čas radioaktivnega jodida (ta znaša okrog 6,6 ur) (150)

C. REZULTATI IN DISKUSIJA

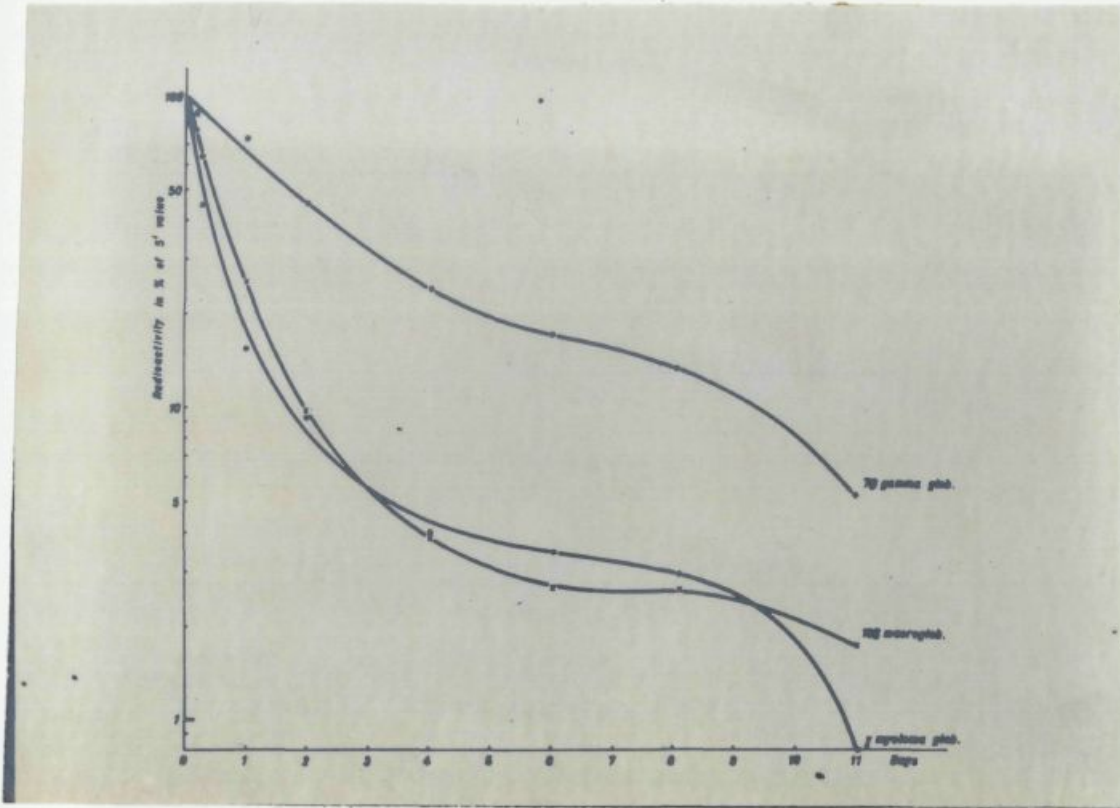
Zivljenjska doba humanega makroglobulina v organizmu normalnega in imuno-tolerantnega zajca.

Slika 1 kaže padec celotne telesne radioaktivnosti treh zajcev, katerim so bili vbrizgani z ^{131}J markirani 7S, 19S in gama mielomski gama globulin, izolirani iz humanega seruma. Vsaka krivulja je sestavljena iz dveh delov: začetnega dela (1.-4. dan), ko se odvija normalna katabolna eliminacija posameznih frakcij - ter drugega dela (po 4. dnevu), ko ji sledi imunološka eliminacija, ker sprožijo heterologne humane beljakovine v zajcu produkcijo anti-teles. Zaradi poznane retencije razgradnih produktov v organizmu, tega preloma na sliki 1 ne vidimo dobro, pač pa postane jasen, če pogledamo padec intravaskularne radioaktivnosti ^{131}J makroglobulina v primeri s krivuljo celotne telesne aktivnosti v sliki 2.

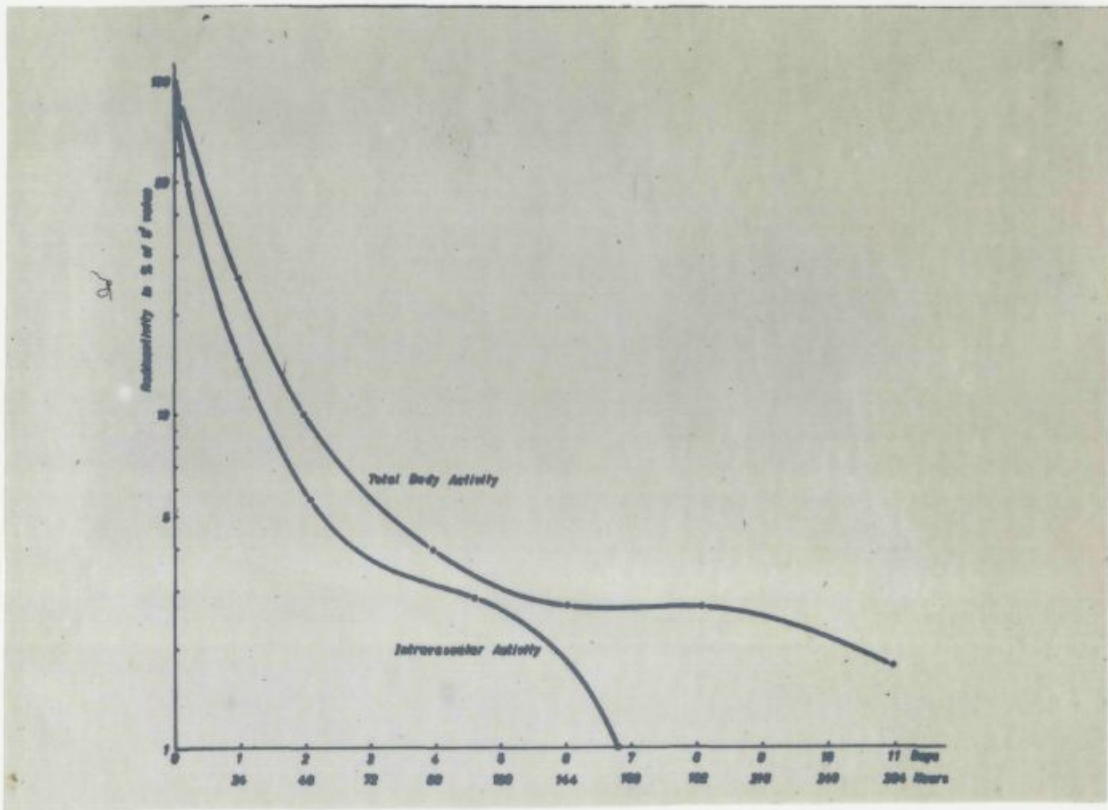
Eksperiment na sliki 1 naj služi kot umeritveni eksperiment za vse nadaljne zaključke, ki bi jih želeli oblikovati na podlagi metaboličnega obnašanja humanega makroglobulina v zajcu, s predpostavko seveda, da upoštevamo pri kritičnem vrednotenju le začetni del eliminacijskih krivulj.

Groba ocena nam da katabolične razpolovne čase, ki so za

7S gama globulin	2,5 - 3 dni
19S gama globulin	0,5 dneva
7S mielomski gl.	≤ 0,5 dneva



Slika 1.



Slika 2.

Edini poznani podatek o kataboličnem razpolovnem času T/2 humanega 7S gama globulina v organizmu zajca dajeta Spiegelberg+Weigle (145). Iz navedene tabele je razviden T/2 posameznih frakcij v zajcu:

		Razpon	Fovpr.
T/2	zajčji (homologni) 7S	4,5-7,5 dni	6,0 dni
	humani (heterologni) 7S	3,7-5,8 "	5,0 "
	mor. pres. "	2,9-3,7	3,3
	konjski "	1,6-1,8	1,7
	bovini "	1,4-1,8	1,6
	mišji "	1,2-1,7	1,5

Temu lahko dodamo se podatke, ki jih za homologni 7S in 19S pri zajcih navajata Taliaferro+Talmage (100):

T/2 zajčja (homologna) 19S antitelesa	2,81 ± 0,12 dni
	3,0 ± 0,33 "
zajčja (homologna) 7S antitelesa	5,5 ± 0,12 "

ter podatke za obe frakciji v homolognem humanem eksperimentu:

Cohen (99) T/2 humani (homologni) 7S gama globulin	21- 26 dni
Barth(103) T/2 humani (homologni) 19S "	5 dni

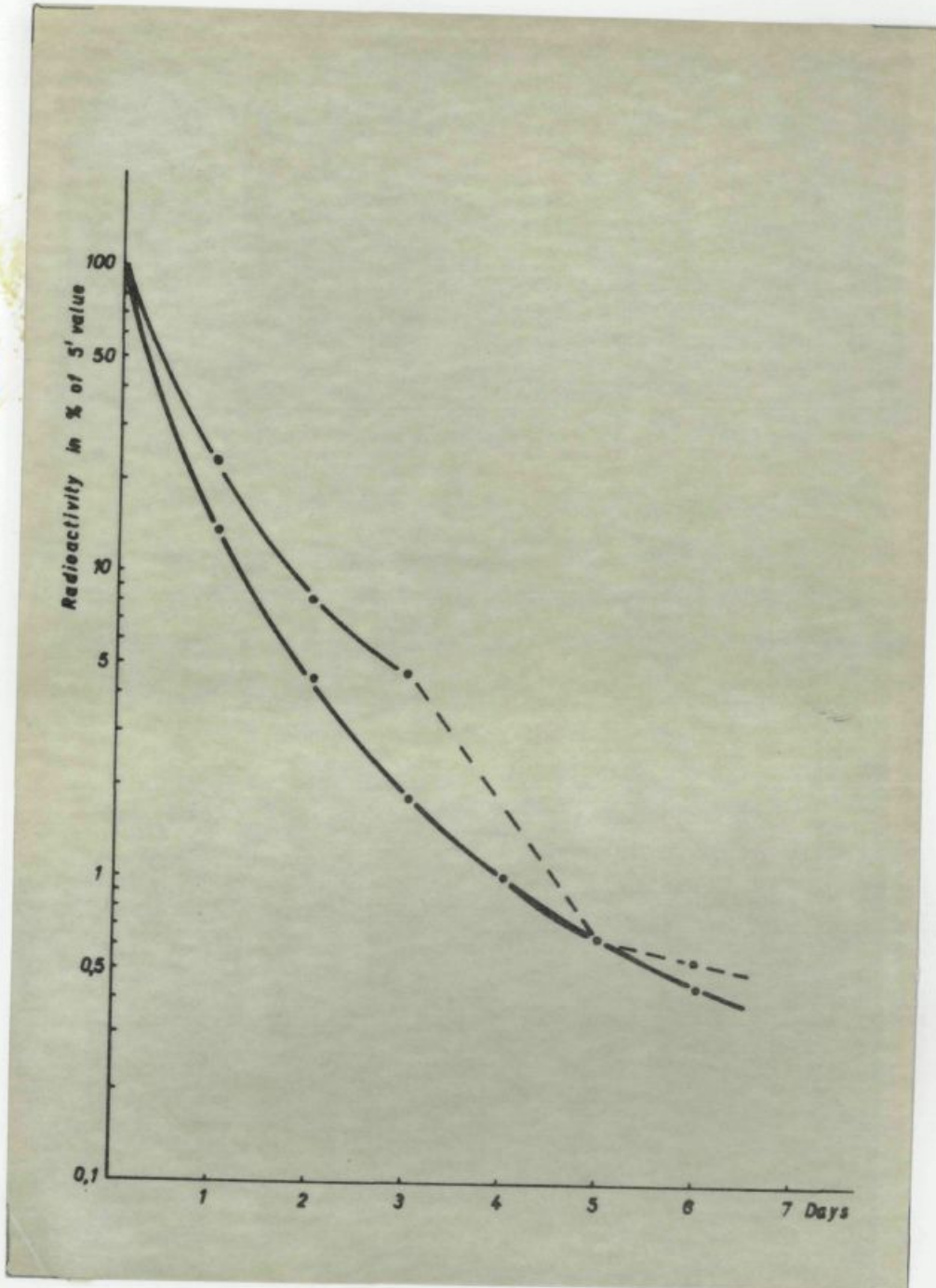
Iz primerjav lahko zaključimo, da se humani makroglobulin v homolognem eksperimentu eliminira 4-5 krat hitreje kot homologni 7S gama globulin in da je ta razlika precej manjša v homolognem zajčjem eksperimentu. Isto (humano) razmerje lahko najdemo s študijem humanih frakcij v zajcu (2,5 oz. 0,5 dni). To pomeni, da poleg vrstno specifičnih determinant, ki relativno pospešijo razgradnjo heterolognih frakcij, o metabolični usodi posameznih homolognih in heterolognih komponent

odločajo predvsem njihove individualne determinante (karakteristike). Če drži, da odločajo o hitrosti razgrajevanja deli peptidne verige A, kot je dokazal Spiegelberg (145, glej tudi poglavje Katabolizem antiteles), nas ne preseneča, da je eliminacija humanega 7S, 19S in mielomskega paraproteina različna, saj vemo, da se ^{ti}na eni strani razlikujejo po svoji kemični sestavi, na drugi strani pa po svoji antigeni specifičnosti, ki so vezane prav na člen A. (glej Struktura antiteles).

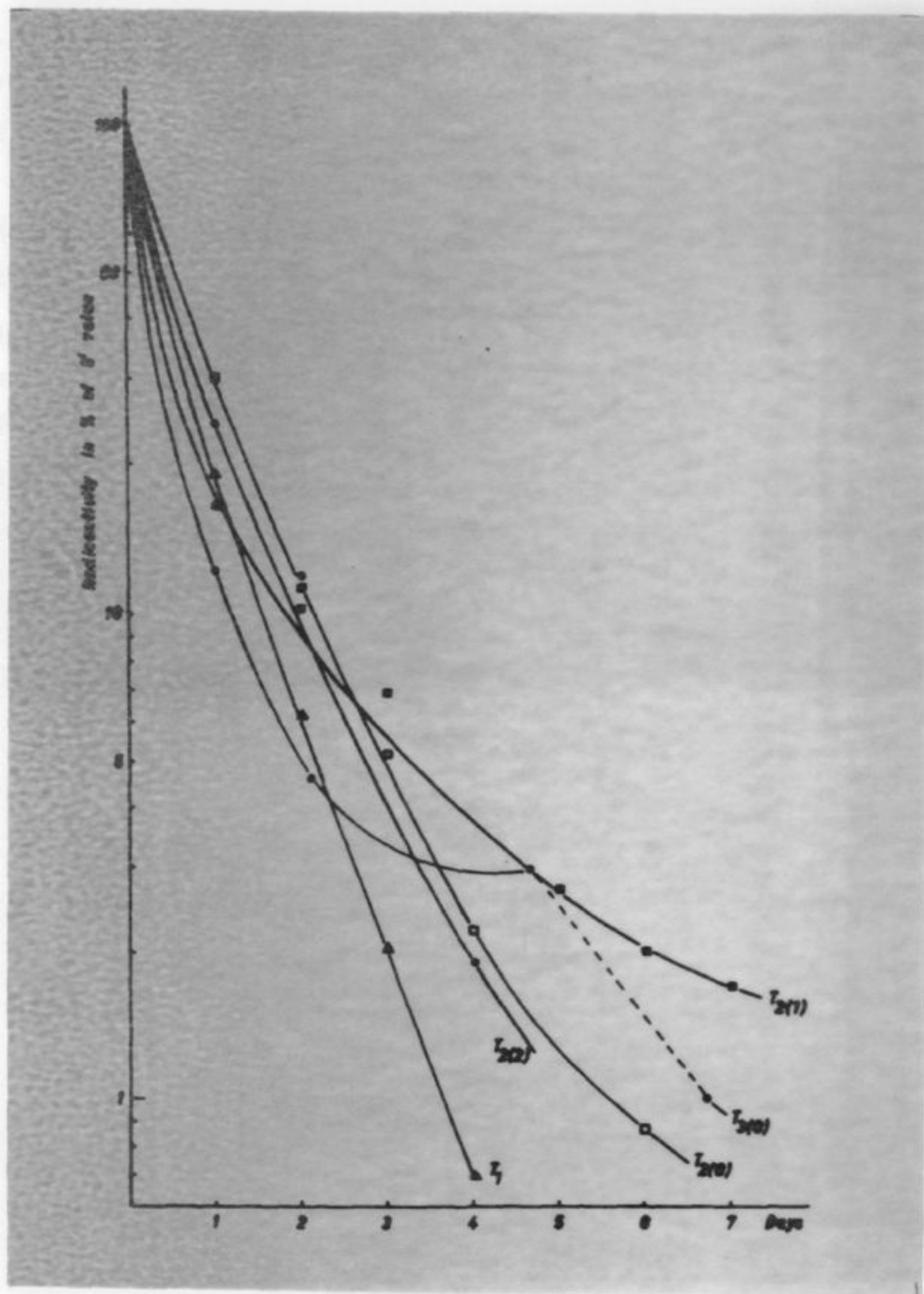
Eliminacija intravaskularne in celotne telesne radioaktivnosti je prikazana na sliki 2. Le malo makroglobulina prodre v ekstravaskularni prostor. Krivulji potekata paralelno in se razideta le v fazi, ko nastopi imunološka eliminacija.

Slika 3. predstavlja dva eksperimenta, kjer sem analizirala eliminacijo ¹³¹J alfa makroglobulina v netolerantnem zajcu. T/2 intravaskularne aktivnosti je skoro popolnoma enak tistemu pri gama makroglobulinu. Imuna eliminacija alfa makroglobulina nastopi pri enem od zajcev že zelo zgodaj, pri drugem pa vsekakor ne pred 6. dnem po inokulaciji. Z ozirom na to, da sta si alfa in gama makroglobulin podobna po svoji molekularni masi, kot tudi po količini na posamezne molekule vezanih ogljikovih hidratov, lahko iz navedene koincidence izvajamo dalekosežne zaključke.

Na sliki 4 so sumarično prikazane krivulje intravaskularne aktivnosti raznih zajcev, inokuliranih z različnimi preparacijami gama makroglobulinov. Vsi zajci pri T-1 in T-2 so bili tolerantni do gama makroglobulina, medtem ko T-3 ni bil. Povprečno in zelo grobo ocenjen T/2 je med 1/2 in 3/4 dneva. Neekspotencialni potek krivulje T-2/1 si lahko razlagamo z



Slika 3.: Eliminacija humanega alfa makroglobulina iz seruma zajca.



Slika 4: Eliminacije raznih preparacij normalnega humanega gama makroglobulina iz seruma zajcev.
(T-1 in T-2 = imunotolerantni zajci)

neuspelo preparacijo, kjer je zaradi delno denaturiranih porcij prislo do hitrejše eliminacije (in istočasne ekvilibracije razgradnih produktov z ekstravaskularnim prostorom) v začetnih urah po inokulaciji. Krivulja T-3 je modificirana zaradi že opisane imune eliminacije.

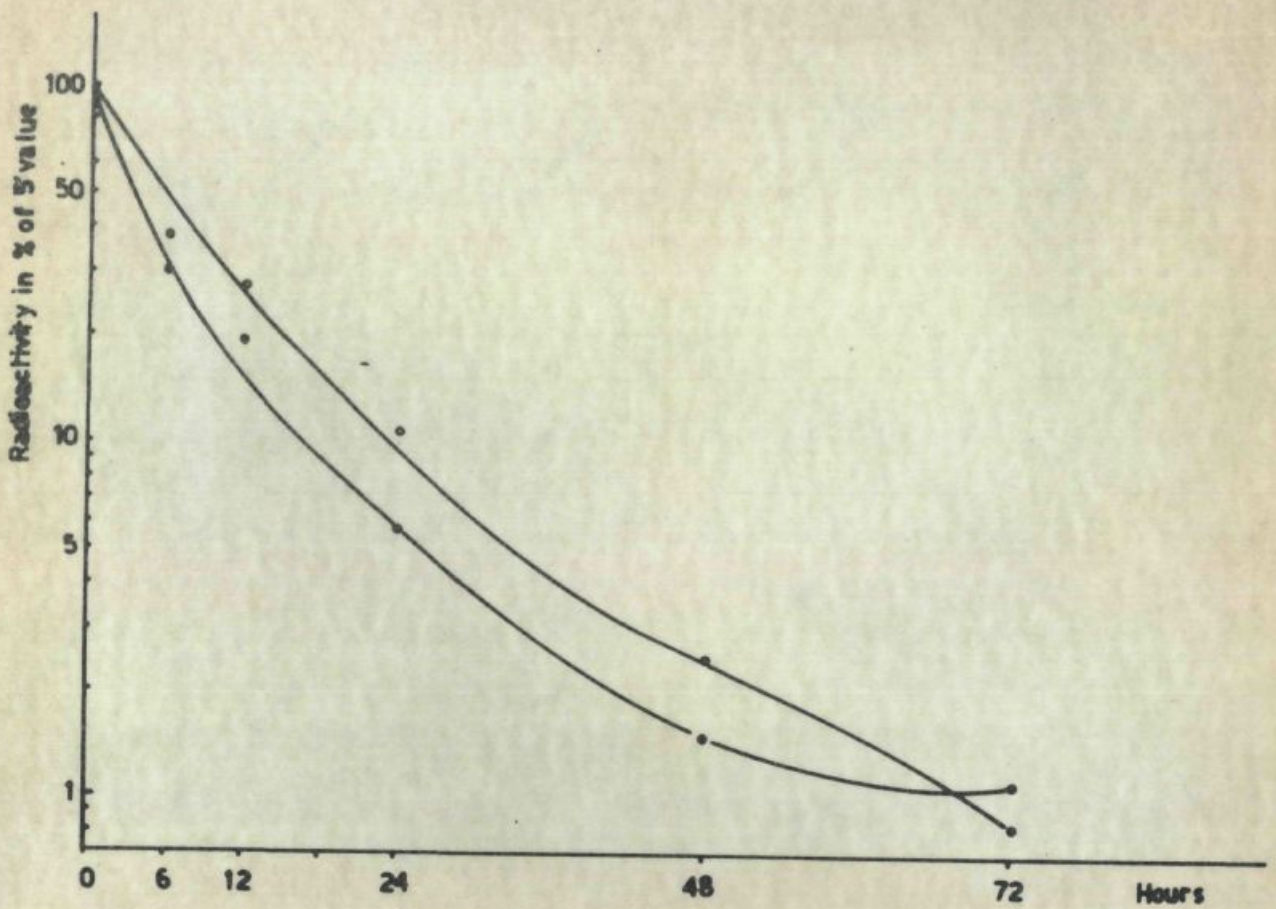
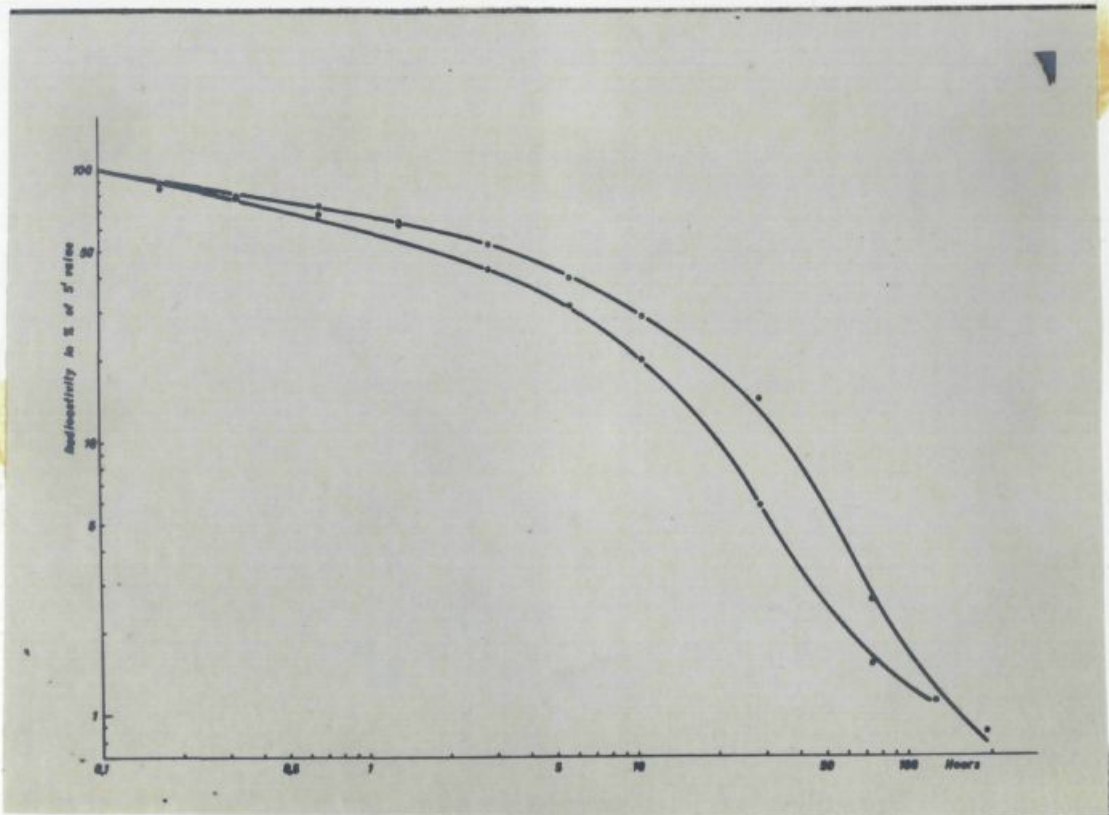
Nevarno bi bilo delati kakršnekoli zaključke o signifikantnosti razlik med posameznimi preparacijami. Kot vidimo iz podatkov Spiegelberga in Taliaferra, pokažejo zajci veliko variabilnost celo pri razgrajevanju lastnih antiteles. Na drugi strani pa se vedno obstoji vprašanje, če so bili zajci v vseh primerih res tolerantni. Kako naj si sicer razlagamo, da dajo z istimi postopki pripravljene makroglobulini teoretsko pričakovano eksperimentalno eliminacijo v primeru T-2/0 in T-2/2, in - če natančneje pogledamo - v primeru T-2/1 precej podobno krivuljo kot T-3, kjer vemo, da zajec ni bil imunološko tolerant.

Brez dvoma se v vsakem metaboličnem poskusu s heterolognimi beljakovinami odvija dvojna igra: molekula humanega makroglobulina, ki smo jo (v idelnem primeru) skrbno izločili iz njenega naravnega okolja, nadaljuje svoje bivanje v organizmu zajca, ki se vendarle po koncentracijah svojih proteolitskih encimov in drugih pogojih loči od človekovega, tako da je čas njenega preživetja modificiran. Na drugi strani pa zajec natančno "razlikuje" tuje makroglobuline od svojih ter odgovori s produkcijo antiteles, ki povzročijo hitro eliminacijo tuje beljakovine.

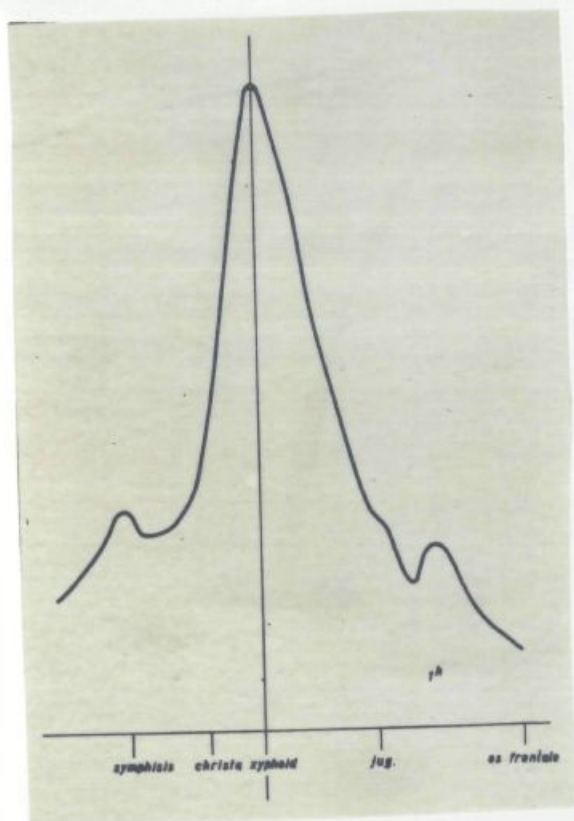
Zaradi kompleksnosti, ki jo le delno lahko predvidimo, je uporaba heterolognih eksperimentov za metabolične poskuse le primerjalne, ne pa absolutne vrednosti.

Eliminacija humanega ^{131}J gama makroglobulina iz
človeškega organizma.

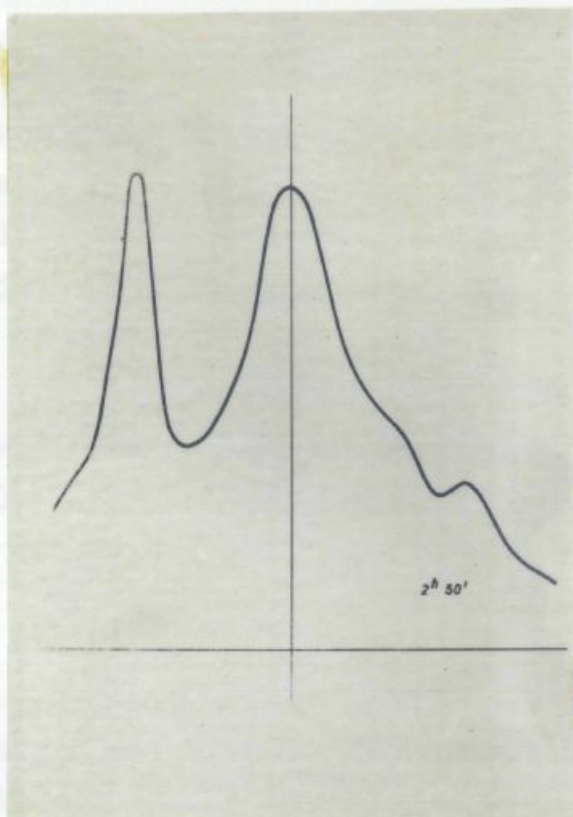
Sliki 5 a in 5 b kažeta padec specifične intravaskularne radioaktivnosti po inokulaciji ^{131}J humanega makroglobulina v plazmi eksperimentalnih oseb S.T. in P.L. V prvi krivulji so vsebovane vse meritve (zaradi velikega časovnega razpona nanesene v dvojno logaritmichnem sistemu), v drugi pa le meritve po dnevnih intervalih. Na žalost ne moremo dobljenih koordinat povezati v linearno semilogaritmično funkcijo, kakršno predvideva Sterlingov model in kakršne dobiva Barth(103). Podobna je Cohenovi (99), le da se od obeh razlikuje po mnogo krajšem $T/2$, ki je po direktnem odčitku iz krivulje okrog 6 ur, po umetni in zelo neprepričljivi ekstrapolaciji začetnega dela krivulje (ki pa se nikoli ne izravna v premico!) pa eventualno 12 ur (pri čemer bi se 20-30% intravaskularne mase ekvilibriralo z ekstravaskularnim prostorom). Za to obstojita dve razlagi: da je bil velik del pripravljenega makroglobulina denaturiran in do take mere "spremenjen", da je nastopil nemudno biološki "screening", ki rezultira v navidezno krajši dobi preživetja nativnih molekul. Isti $T/2$ daje namreč toplotno denatururani albumin (124) - in na drugi strani hipotetična možnost, da je katabolizem makroglobulina kompleksen večfazni model, ki ne odgovarja v svoji integralnosti preprosti eksponentialni eliminaciji 1. stopnje v Sterlingovem modelu. Na podlagi trenutnih podatkov je nemogoče presoditi tehtnost prve predpostavke. Nemara pa bodo navedeni eksperimenti dali nekoliko vpogleda v dinamiko eliminacije in v intermediarne faze pri razgradnji gama makroglobulina. Na slikah 6 a,b,c,d so registrirane profilne meritve (popolnoma identične v obeh eksperimentih) vzdolž telesa. Za topo-



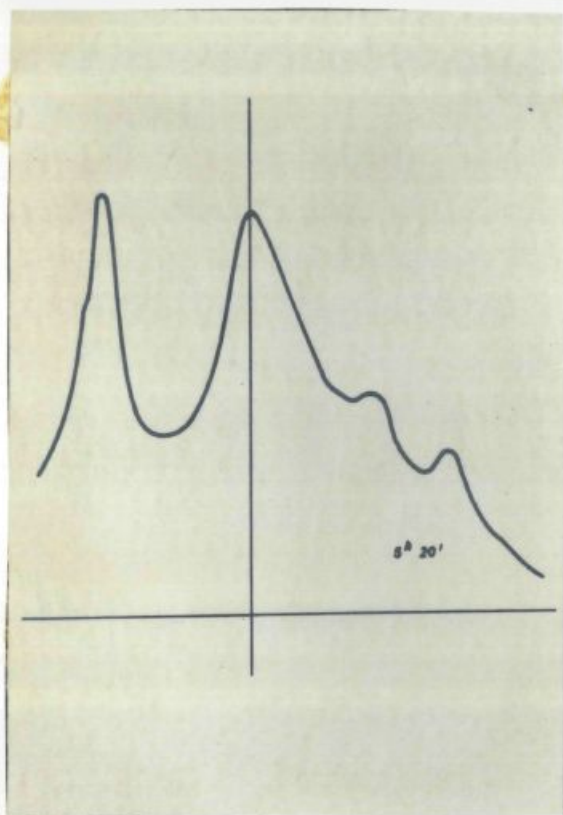
Zgoraj slika 5 a , spodaj slika 5b



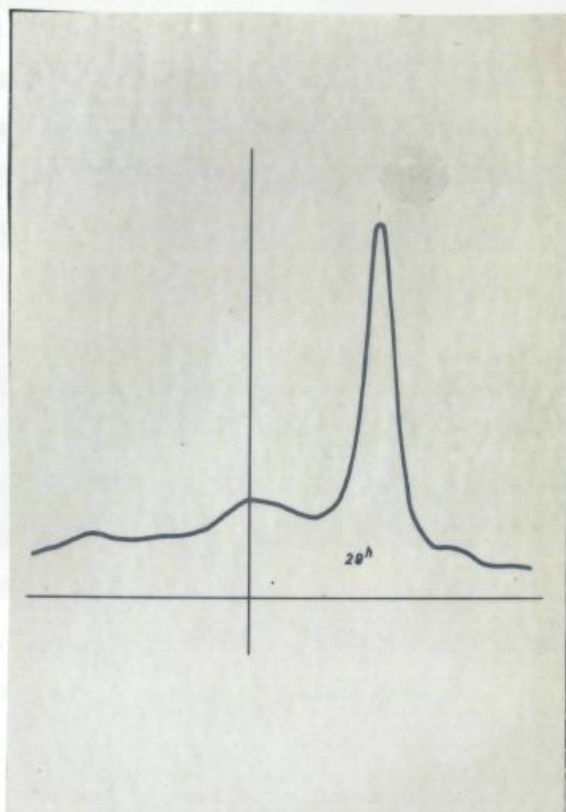
Slika 6 a



Slika 6 b



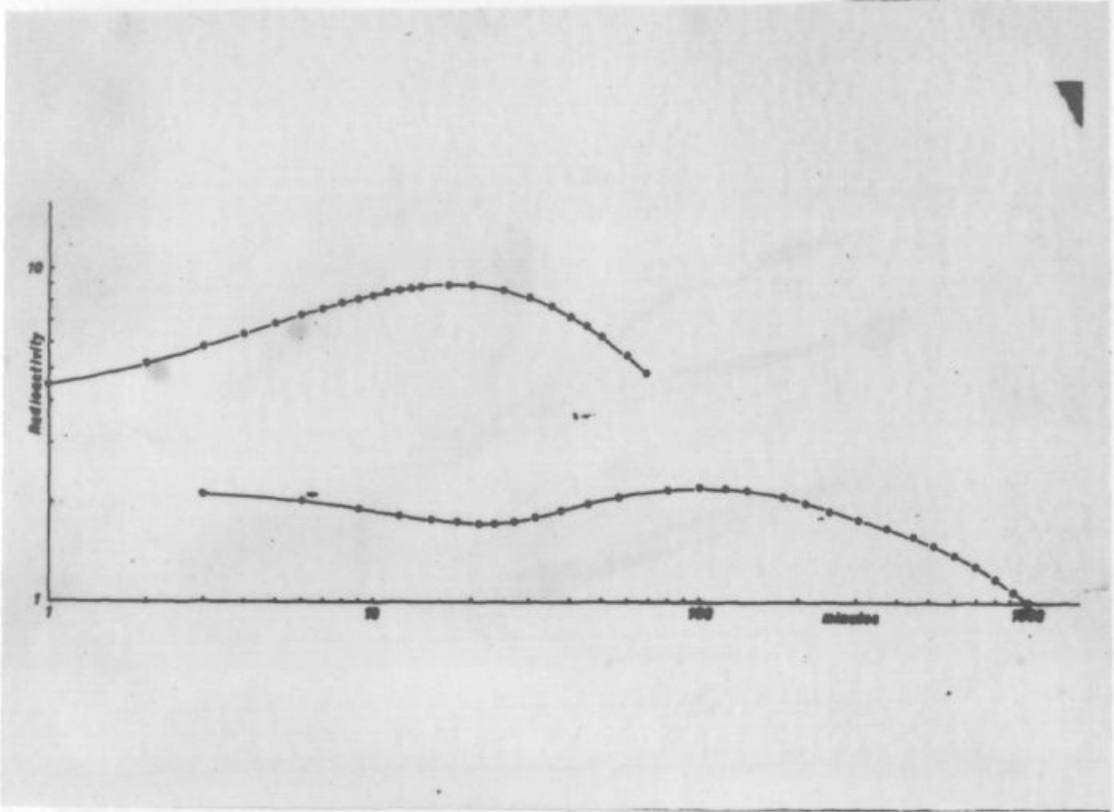
Slika 6 c



Slika 6 d

grafska orientacijo so navedene točke: teme, jugulum, ksifoid, krista ilei, simfiza. Po 1 uri se praktično večina radioaktivnosti nahaja v predelu jetre in le manjši del v salivarnih zležah in mehurju. V naslednjih časovnih razmakih aktivnost v jetri pada do pragu, ki velja najbrž za takratno povprečno aktivnost v krvi in tkivih. Da potekajo premiki v smislu degradacije, sodimo po tem, ker se visoke vrednosti radioaktivnosti pojavljajo v urinu., medtem ko se prosti jod verjetno kopiči v scitnici, kljub temu da je ta bila blokirana.

Ta opazanja lahko koreliramo z nadaljnjo serijo zveznih serijskih meritev radioaktivnosti nad temenom (intra- in ekstravaskularna aktivnost) in nad jetri. Slika 7. Iz nekalibrirane skale je razvidno, da obstoji odločna in prepričljiva zveza med specifično aktivnostjo krvi (oz. krvi + ekstravaskularnega prostora) in aktivnostjo v jetri. Ta začne takoj po začetku eksperimenta naraščati v jetri in doseže maksimum pri 15-20 minutah po inokulaciji. Istočasno pade aktivnost nad temenom, kar ima svoj minimum skoro istočasno, ko je koncentracija aktivnosti v jetri najvišja (20%). Po 20 minutah se začne aktivnost vračati iz jeter v kri, kjer po približno 100 minutah spet doseže izhodno vrednost in nato do 1000 minut (16,6 ur) enakomerno pada. Tu je z detektorji ni bilo mogoče več zasledovati. Dejstvo, da je celokupna aktivnost nad temenom, ki v začetnih fazah res nemara reprezentira pretežno intravaskularno radioaktivnost, enako visoka tudi po vrnitvi krvi iz jeter, ko vendar meritve specifične radioaktivnosti krvnih vzorcev jasno pokažejo samo še 60% prvotne vrednosti, lahko pomeni le eno - namreč: 1. da merimo nad temenom skupno intra- in ekstravaskularno aktivnost



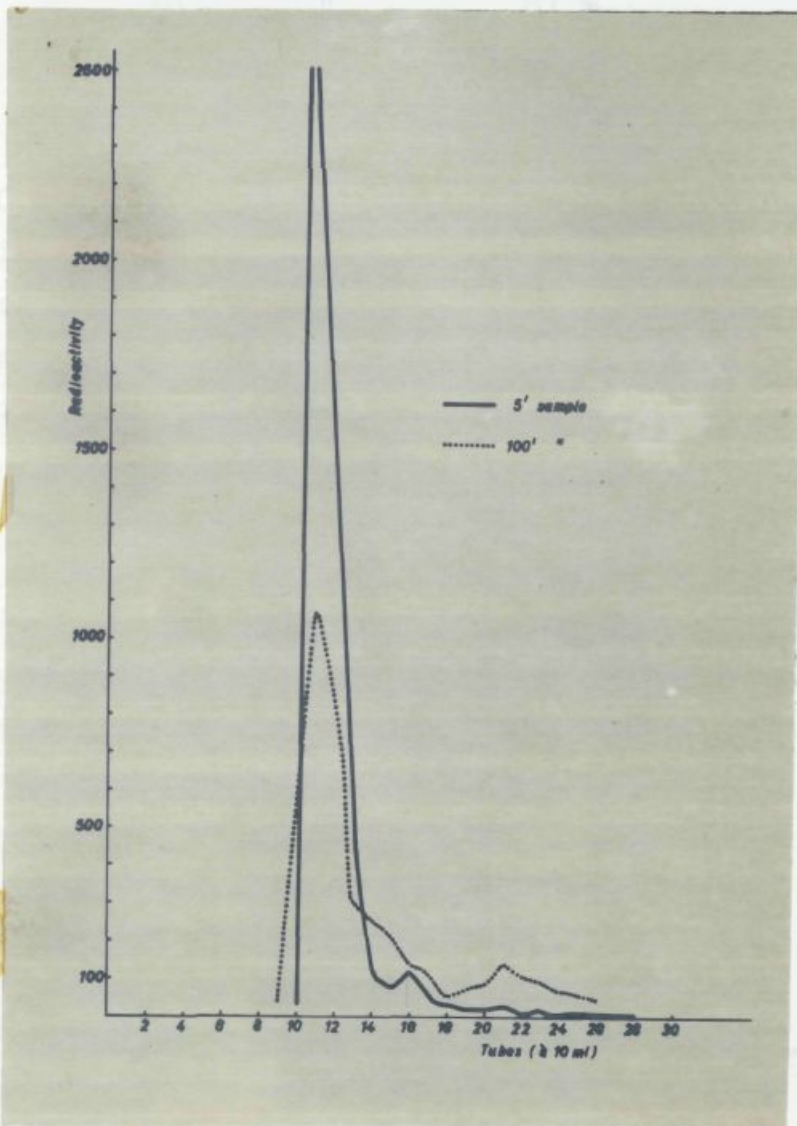
Slika 7. Merjenje radioaktivnosti nad jetri (zgoraj) in nad temenom v časovnih presledkih.

2. da se je moral makroglobulin že v teku prvih 100 minut razgraditi ter da so pri tem nastali produkti difundirali v ekstravaskularni prostor. Po 2^h 50' (170 minutah) ko zasledimo aktivnost že v urinu, tudi pade absolutna aktivnost nad temenom.

Da bi razčistila to vprašanje, sem 5 minutni in 100 minutni vzorec seruma testiranega S.K. analizirala s pomočjo filtracije skozi gel G-200. Slika 8. Medtem ko je v prvem vzorcu vsa radioaktivnost zbrana v lepem simetričnem vrhu, ki odgovarja makroglobulinu (simetričnost je dokaz, da ni bilo vmes večjih agregatov - razen, če so se ti, kar je teoretično tudi verjetno, takoj ujeli v jetri?) in le 5% izplenjene aktivnosti se nahaja v drugem vrhu (7S).

Po 100 minutah je celokupen izplen radioaktivnosti seveda manjši (50% začetne vrednosti - kar ustreza krvni krivulji), vendar je distribucija aktivnosti razporejena med prvim vrhom (50%) in med dvema, ki se pojavljata kasneje v elucijskem diagramu (skupno 50%). To pomeni, da je pri 100 minutah 50% apliciranega makroglobulina depolimeriziranega v manjše enote, po velikosti odgovarjajoče velikosti 7S gama globulinu in albuminu v umeritvenem diagramu. Eventualno : makroglobulin - 7S enote makroglobulina - A clen (55.000 M.W.) Prehod med prvim in drugim vrhom je zvezen, medtem ko nastopa tretji vrh samostojno.

Če temu dodamo še vrednosti proteinsko vezane aktivnosti v posameznih vzorcih, odvzetih v začetnih fazah eksperimenta (identični rezultati za S.T. in P.L.), smo pravzaprav svoje informacije izčrpali:



Slika 8.

5 minutni in 100 minutni vzorec seruma po filtraciji skozi gel G-200

5 minutni vzorec	100 %
10 "	90 %
20 "	90 %
40 "	87 %
80 "	82 %
172 "	78 %
342 "	72 %

Po 100 minutah je torej okrog 20% proteinske aktivnosti že v obliki, ki je ne moremo več oboriti s triklorocetno kislino (saj imamo že po 1 uri aktivnost v urinu!) Prestalih 80% oborimo sicer s triklorocetno kislino, kar pa ne pove, v kakšni obliki se te pravzaprav nahajajo. Znano je namreč, da na ta način oborimo intaktne molekule, kot tudi nekatere višje peptide.

Ali lahko na podlagi vseh navedenih eksperimentov zaključimo, da poteka razgradnja makroglobulina v obliki zvezne depolimerizacije preko 7S podenot do peptidov, od katerih ima vsak spet svojo lastno razpolovno dobo in se eventualno z različno hitrostjo ekvilibrira z ekstravaskularnim pulom; Naša krvna krivulja v tem primeru predstavlja rezultanto različnih neodvisnih kataboličnih krivulj in se zravna v premico eventualno šele, ko usahne vir intaktnih makroglobulinskih molekul. Ker lahko domnevamo, da so jetra v veliki meri zapletena v ta dogajanja, bi to lahko pričakovali morda po 29 urah (slika 6d), ko v njih ni več bistvenih količin makroglobulina. Na to bodo lahko odgovorili le nadaljni eksperimenti, v katerih bi eventualno uporabili umetno pripravljene makroglobulinske podenote 7S tipa, na drugi strani pa izolirali hipotetične depolimerizirane enote direktno s pomočjo filtracije na G-200 in jih analizirali v posebnem kataboličnem poskusu. Prav tako bi izvedli kompletnejšo longitudinalno študijo po že nakazanem konceptu (slika 8).

$T/2$ makroglobulina, katerega odčitamo iz eliminacijske krivulje je torej po teh zaključkih le indeks, ki se nanaša predvsem na populacijo še intaktnih molekul ter tisti del njenih metabolitov, ki so po ekvilibriranju z ekstravaskularnim prostorom še ostali v cirkulaciji (in ki eventualno še opravljajo svoje biološke funkcije). Če to drži za vsak makroglobulin ali samo za tistega, ki sem ga za opisane eksperimente uporabila, je vprašanje. Primerjava z eliminacijo toplotno denaturiranih albuminskih kompleksov (124) je dala sicer v mnogih ozirih podobne podatke o kinetiki clearensa, z minimumom nad temenom pri 15minutah in ponovnim maksimumom v krvi po 1 uri. Vendar je bilo ob tem času mogoče oboriti s trikloroacetno kislino le 30 % radioaktivnosti (pri makroglobulinih 85%), kar pomeni, da je potekel proces degradacije pri albuminskih kompleksih mnogo radikalnejše.

V teoretskem delu nakazana dispozicija o eventualni vlogi molekularnih dimenzij za hitrost razgradnje nemara ni popolnoma zgrešena. Mogoče drži, da so večje molekule sicer fagocitirane, da pa obstoji diskriminacijski mehanizem, ki native molekule podvrže normalnemu fiziološkemu razpadu (preko manjših, morda še učinkovitih fragmentov), delno spremenjene ali celo denaturirane pa bolj radikalni proteolizi. Ker se eni in drugi razpadni produkti ekvilibrirajo z ekstravaskularnim prostorom, eliminacijske krivulje nemara ne pokažejo kvalitativnih razlik med obema dogajanjima.

S kakršnimikoli dalekosežnejšimi zaključki bi raje počakala, dokler ne izvedem nadaljnjih poskusov, ki smo jih že zasnovali s kolegi radiologi in matematiki, sodelavci Onkološkega instituta v Ljubljani.

Zaključki ob pregledu rezultatov

1. Obstojijo možnosti za izolacijo imunokemijsko čistega normalnega humanega gama makroglobulina. Vendar je njehova uporaba za metabolične študije še sporna zaradi možnosti, da so bili v teku preparativnih postopkov ali radioaktivnega jodiranja spremenjeni in se pretirano hitro eliminirajo.
2. Predložen je metabolični model makroglobulinskega katabolizma z naznačeno verjetnostjo, da se ta odvija v jetri; Nerazčiščen je ostal problem, če so makroglobulini sledili analogiji z albuminskim agregatom zaradi svoje molekularne velikosti, ali zato, ker so bili delno denaturirani. Omenjenih je nekaj smernic, po katerih nameravam v bodočnosti analizirati nakazana vprašanja.
3. Heterologni eksperimenti z analizo eliminacije humanih makroglobulinov, 7S gama globulinov in mielomskega globulina v zajcih imajo določeno orientacijsko vrednost. Vidim določeno možnost za njihovo uporabo v klinične namene pri diagnosticiranju paraproteinemij, če bi serijska opažanja pokazala, da se paraproteini v celoti hitreje eliminirajo iz zajcjega organizma kot ustrezne frakcije normalnih antiteles.

7. Brennan, L., Vannier, W. B. and Grounau, R.
J. Expt. Med. 117:603 (1963)

8. Fahey, J. L.: Heterogeneity of human gamma globulins
Advans. Immunology 2:42 (1962)

9. Cohen, S.: Properties of the peptide chains of normal
 and pathological human gamma globulins.
Biochem. J. 69:774 (1963)

10. Cohen, S.: Heterogeneity of gamma globulins
Advans. Immunology, 2:1-42 (1962)

11. Cohen, S.: The gamma globulins
 Academic Press, London, N.Y. (1962)

12. Fahey, J. L.: Chemical studies of monoclonal
 gamma 24 and normal human gamma globulins
 in systems and systems of immune response
J. Biol. Chem. 237:449 (1962)

B i b l i o g r a f i j a

1. Heidelberger, M., Pedersen, K.O.: The molecular weight of antibodies.
J.expt.Med. 65 :393 (1937)
2. Tiselius, A. and Kabat, E.A.: An electrophoretic study of immune sera and purified antibodies.
J.expt.Med. 69:119 (1939)
3. Kabat, E.A.: The molecular weight of antibodies.
J.expt.Med. 69:103 (1939)
4. Heremans, J.F., Heremans, M.Th. and Schultze, H.E.: Isolation and description of a few properties of the beta 2A globulin of human serum.
Clin.Chim.Acta 4:96 (1959)
5. Heremans, J.F.: Les globulines sériques du système gamma.
Arscia, Bruxelles (1960).
6. Heremans, J.F. and Vaerman, J.F.:
Beta 2A globulin as a possible carrier of allergic reaginic activity.
Nature 193:1091(1962)
7. Fireman, P., Vannier, W.E. and Goodman, H.C.
J.expt.Med. 117:603 (1963)
8. Fahey, J.L.: Heterogeneity of human gamma globulins.
Advan.Immunology 2:42 (1962)
9. Cohen, S.: Properties of the peptide chains of normal and pathological human gamma globulins.
Biochem.J. 89:334 (1963)
10. Cohen S.: Heterogeneity of gamma globulins.
Modern Trends in Immunology, str.25 (1963)
Butterworths, London.
11. Putnam: The Plasma Proteins
Academic Press, London, N.Y. (1960)
12. Fahey, J.L.: Chromatographic studies of anomalous gamma 2A and macroglobulins and normal gamma globulins in myeloma and macroglobulinemic sera.
J.Biol.Chem.: 237:440 (1962)

13. Islikér, H.C.: The chemical nature of antibodies
Adv. Prot. Chem. 12:287 (1957)
14. Kabat, E.A.: Experimental Immunochemistry.
C.C. Thomas, Springfield (1961)
15. Edelman, G.M., Benaceraf, B., Ovary, Z. and Paulik, M.D.:
Structural differences among antibodies of different
specificities.
Proc. Nat. Acad. Sci. 47:1751 (1961)
16. Porter, R.R.: Gamma globulins and antibodies.
V "The Plasma Proteins". Academic Press (1960).
17. Askonas, B.A., Farthing, C.P., Humphrey, J.H.:
The significance of multiple antibody components in
serum of immunised rabbits.
Immunology 3:336 (1960).
18. Sober, H.A. in Peterson, E.A. Protein chromatography
on ion exchange cellulose.
Fed. Proc. 17:1116 (1958)
19. Futnam, F.W.: Plasma cell myeloma and macroglobulinemia I.
New England J. Med. 261:902 (1959)
20. Kunkel, H.G., Mannik, M., Williams, R.G.:
Individual antigenic specificity of isolated antibodies.
Science 140:1218 (1963)
21. Porter, R.R. Gamma globulins and antibodies.
In The Plasma Proteins. Ed. Putnam. Ac. Press (1960).
22. Sober, H.A., Gutter F.J., Wyckhof, M.M., Peterson, E.A.
Chromatography of proteins. II.
J. Am. Chem. Soc. 78:756 (1956)
23. Hall, C.E., Nisonoff, A., Slayter, H.C.
Electron microscopic observations of rabbit antibodies
J. Bioph. Biochem. Cytol. 6:407 (1959)
24. Smarda, J., Wiederman N.: Ultrafiltration measurement
of paraprotein particles in four cases of macroglo-
bulinemia.
Experientia 13: 397 (1957)
25. Cohen, S., Porter, R.R.: Structure and biological
activity of immunoglobulins.
Adv. Immunol. 4:287 (1964)

26. Korngold, L., Van Leeuwen, G.:
The use of cross reacting antiserums for the study
of antigenic heterogeneity of mammalian gamma 2 glob.
Int. Arch. Allergy 19:271 (1961)
27. Fahey, J.L., Solomon, A.: Two types of gamma and beta 2A
myeloma proteins, macroglobulins and Bence Jones prot.
J. Clin. Inv. 42:811 (1963)
28. Tomasi, T., Ziegelbaum, S.: The excretion of gamma
globulin in human saliva, colostrum and urine.
Arthr. Reum. 5:662 (1962).
29. Schultze, H.E.: The synthesis of antibodies and proteins
Clin. Chim. Acta 4:610 (1959).
30. Benaceraf, B., Ovary, Z., Bloch, K.J., Franklin, E.C.:
J. Exptl. Med. 117:937 (1963)
31. Clausen, J., heremans, J., Heremans, M.Th., Rask-Nielsen, R.
Immuno-electrophoretic studies of serums from mice
carrying transplantable plasma cell leucemias.
J. Nat. Cancer Inst. 22:57 (1959)
32. Yagi, Y., Maier, F., Pressman, D., Arbesman, C., Reisman, R.,
Lenzner, A.: Multiplicity of insulin binding antibodies
in human sera.
J. Immunol. 90:760 (1963)
33. Kinkel, M.G., Rockey, J.H.: Beta 2A and other immune
globulins in isolated anti A- antibodies.
Proc. Soc. Exp. Biol. N.Y. 113:278 (1963)
34. Franklin, E.C.: Two types of gamma 1A globulin in sera
from normals and patients with multiple myeloma.
Nature 195:392 (1963)
35. Thorbecke, G.J., Franklin, E.C.: Antigenic cross- reactivity
between 7S and 19 S rabbit gamma globulin.
J. Immunol. 87:753 (1961)
36. Rask-Nielsen R., Loutie, R., Clausen, G., Christensen, H.E.
Heremans, J.F., Brauns G.:
Rev. Franc. Etud. Clin. Biol. 5:1000, (1960)
37. Van der Scheer, J., Lagsdin, J.B., Wycoff, R.G.W.:
Electrophoretic and ultracentrifugal analyses of
antipneumococcal horse sera.
J. Immunol. 41:209 (1941)

38. Makinodan, T., Vengozian, N., Canning, R.E.:
Demonstration of normal serum macroglobulin coprecipitating with the bovine serum albumin-chicken anti bovine serum albumin precipitate.
J. Immunol. 85:439 (1960)
39. Kunkel, H.G.: Macroglobulins and high molecular antibodies v *The Plasma Proteins*. Ac. Press (1960)
40. Fahey, J.L., Goodman, H.C.: Characterisation of anti-thyroglobulin factors in human serum.
J. Clin. Inv. 39:1259 (1960)
41. Waldenström, J.: Incipient myelomatosis or essential hyperglobulinemia with fibrinogenopenia- new sindrom?
Acta Med. Scand. 117:216 (1944).
42. Korngold, L., Van Leeuwen: Macroglobulinemia II.
J. Exp. Med. 106:477 (1957)
43. Kunkel, H.G., Franklin, E.C., Müller-Eberhart, H.J.:
Studies on the isolation and characterisation of the "rheumatoid factor".
J. Clin. Invest. 38:424 (1959)
44. Deutsch, H.F., Morton J.J.: Human serum macroglobulins and dissociation units.
J. Biol. Chem. 231:1107 (1958)
45. Franek F.: Isolation and some molecular characteristics in pig gamma macroglobulin.
Czech. Chem. Commun. 27:2808 (1962)
46. Kovacz, A.M., Daune, M.: Masse et dimensions d'une molécule de macroglobulin.
Biochim. Biophys. Acta 50:249 (1961)
47. Valentine, C. J. The shape of protein molecules suggested by electron microscopy.
Nature 184:1838 (1959)
48. Deutsch H.F., Morton, J.J.
Dissociation of human serum macroglobulin.
Science, 125:600 (1957)
49. Glenchur, H., Zinneman, H.H., Briggs, D.R.
Macroglobulinemia. Report of two cases.
Ann. Int. Med. 48:1055 (1958)

50. Kunkel, H.G., Rockley J.H., Tomasi, T.:
Immunologic Approaches to Problems in Microbiology.
Rutgers Univ.Press, New Brunswick, N.Y. (1961).
51. Isliker, H.J. na NRC meeting on gamma globulins.
Washington (1962).
52. Anfinsen, C.B., Haber, E.: Studies on the reduction
and reformation of protein disulphide bonds.
J.Biol.Chem.236:1361 (1961).
53. Franklin, E.: The immune globulins- their structure and
function and some techniques for their isolation.
Progress in Allergy, Vol.VIII (1964).
54. Nisonoff, A., Thorbecke, G.J.: Immunochemistry
Ann.Rev.Biochem.33:119 (1959)
55. Porter, R.R.: The hydrolysis of rabbit gamma globulin
and antibodies with crystalline papain.
Biochem.J.73:119(1959)
56. Nisonoff, A., Woernley, D.C.: Effect of hydrolysis by
papain on the combining side of antibody.
Nature 183:1325 (1959)
57. Edelman, G.M.: Dissociation of gamma globulin.
J.Am.Chem.Soc.81:3155(1959)
58. Fleischman, J.B., Porter, R.R., Pain, R.H.:
Reduction of gamma globulin.
Arch.Biochim., Suppl.1:174 (1962)
59. Franek, F.: Dissociation of animal 7S gamma globulin
by cleavage of disulphide bonds.
Biochem.Biophys. Res.Comm.4:28 (1961)
60. Ramel, A., Stellwagen, E., Schachman, H.K.:
Subunits of proteins.
Fed. Proc.20:1387 (1961)
61. Porter, R.R.: The structure of gamma globulins and
antibodies. Symposium on Basic Problems of Neoplastic
Disease. Ed. A.Gellhorn and E.Hirschberg.
Columbia University Press (1962)
62. Humphrey, J.H. and White, R.G.: Immunology for Students
of Medicine. Second Edition.
Blackwell Scientific Publication, Oxford (1964)

63. Cebra, J.J., Givol, D., Bilman, H.J., Katchalsky, E.:
A two stage cleavage of rabbit gamma globulin by
water insoluble papain preparation followed by
cysteine.
J. Biol. Chem. 236:1720 (1961)
64. Nisonoff, A., Markus, G., Wissler, F.C.:
Separation of univalent fragments of rabbit antibody
by reduction of a single, labile disulphide bond.
Nature 189:293 (1961)
65. Edelman, G.M., Heremans, J.F., Heremans, M.Th., Kunkel, H.G.:
Immunological studies of human gamma globulin.
J. Exp. Med. 112:203 (1960)
66. Franklin, E.C.: Structural units of human 7S gamma glob.
J. Clin. Inv. 39:1933 (1960)
67. Eriksson, S., Sjöquist, J.: Quantitative determination
of N terminal amino acids in serum proteins.
Biochem. Biophys. Acta 45:290 (1960)
68. Edelman, G.M., Poulik, M.D.: Studies on structural units
of the gamma globulins.
J. Exp. Med. 111:861 (1961)
69. Cecil, R., Wake, R.G.:
Biochem. J. 82:401 (1962)
70. Pain, R.H.: Molecular weight of reduced chains in
gamma globulins.
Biochem. J. 88:234 (1963)
71. Crumpton, M.J., Wilkinson, J.M.: Amino acid analysis of
reduced gamma globulins.
Biochem. J. 88:228 (1963)
72. Cohen, S.: Properties of the peptide chains of normal
and pathological human gamma globulins.
Biochem. J. 89:334 (1963)
73. Harhoe, M., Osterland, C.K., Kunkel, H.G.: Localisation
of two genetic factors (Gm and Inv) to different areas
of 7S gamma globulin molecules.
Science 136:979 (1962)
74. Franklin, E.C., Fudenberg, H., Meltzer, M., Stanworth, D.R.:
The structural basis for genetic variations of normal
human gamma globulins
Proc. nat. acad. Sci. Wash. 48:914 (1962)

75. Lawler ,S.D., Cohen,S.: in press
76. Edelman,G.M., Benaceraf,B., Ovary,Z., Foulk,M.D.:
Structural differences among antibodies of different
specificities.
Proc.Nat.Acad.Sci.47:1751 (1961)
77. Cohen,S. osebno sporocilo
78. Edelman,G.M., Galley,J.A.: The nature of Bence Jones
proteins, chemical similarities to polipeptide chains
of myeloma globulins and normal gamma globulins.
J.Exp.Med.116:207 (1962)
79. Franklin,E.C., Meltzer,M., Guggenheim,F., Lowenstein,J.:
Feder.Proc.22:264 (1963)
80. Referati in razgovori na kongresu o imunotoleranci,
Locarno, maj 1965.
81. Lo Spalluto,J., Miller,W.Jr., Doward,B.D., Fink,C.W.:
The formation of macroglobulin antibodies I. Studies on
adult humans.
J.Clin.Inv.41:1415(1962)
82. Bauer,D.C., Mathies,M.J., Stavitsky,A.B.:
Sequences of synthesis of gamma 1 macroglobulin and
gamma 2 globulin antibodies during primary and secondary
response to proteins, Salmonella antigens and phage.
J.Exp.Med. 117:889(1963)
83. Uhr,J.W., Finkelstein,M.S.: Antibody formation IV.
Formation of rapidly and slowly sedimenting antibodies
and immunological memory to phage ϕ X174.
J.Exp.Med.117:457(1963)
84. Kim,Y.B., Bradley,S.G., Watson,D.W.: Caractérisation
of early 19S and late 7S immunoglobulins in mouse.
J.Immunol.93:798 (1964)
85. Nezlin,R.Z. Abstrakt
Biohimija 29:548 (1964)
86. Talmage,D.W., Freter,G.G., Taliaferro,W.H.:
The antibodies of related specificity but different
hemolytic efficiency separated by centrifugation.
J.Inf.Dis.98:300 (1956)

VIII

87. Humphrey, J.H.: Pogovori o neobjavljenih eksperimentih, maja 1965.
88. Jarosková, L.: Molecular and cellular basis of antibody formation. Simpozij. Ceska Akad. Znanosti, Praga (1964)
89. Farr, R.S.: J. Inf. Dis. 103:239 (1958)
90. Grey, H.M.: feder. Proc. 22:326 (1963)
91. Smith, R.T.: Response to active immunisation of human infants during neonatal period. Cellular Aspects of Immunity. Ciba Foundation Symposium, Boston (1960)
92. Fink, C.W., Milles, W.E. Jr., Doward, B., Lo Spalluto, J.: The formation of macroglobulin antibodies. II. Studies on neonatal infants and other children. J. Clin. Inv. 41:1422 (1962)
93. Uhr, J.W., Dancis, J., Franklin, E.C., Finkelstein, M.S., Lewis, E.W.: The antibody response to bacteriophage ϕ X 174 in newborn premature infants. J. Clin. Invest. 41:1509 (1962)
94. Hitzig, N.H.: Die physiologische Entwicklung der Immunoglobuline. Helv. pediat. Acta 12:596 (1957)
95. Silverstein, M.M., Uhr, J., Kraner, K., Lukes, R.: Fetal response to antigen stimulus. II. J. exp. Med. 117:799 (1963)
96. Robbins, J.B., Mc Canley, J., Smith, R.T.: Feder. Proc. 22:499 (1963)
97. Svehag, S., Mandel, B.: J. Expt. Med. 119:1 (1964)
98. Dresser, D.W.: Immunological paralysis induced by protein antigens. International Symposium on immunological tolerance, Locarno, maj 1965.
99. Cohen, S., Freeman, T.: Metabolic heterogeneity of gamma globulins. Biochem. J. 76:475 (1960)
100. Taliaferro H., Palmage, D.W.: Antibodies in the rabbit with different rates of metabolic decay. J. inf. Dis. 99:21 (1956)

IX

101. Drivsholm, A.: Turnover rate of myeloma proteins in serum and in urine determined after intravital labelling with glycine 1-C-14-
Acta Med.Scand. 169:503 (1961)
102. Gabuzda, T.G.: The turnover and distribution of ^{131}I labelled myeloma and macroglobulin proteins.
J.Lab.clin.Med. 59:65 (1962)
103. Barth, W.F., Wochner, R.D., Waldman, T.A., Fahey, J.L.: Metabolism of human gamma macroglobulins.
Jour.Clin.Inv. 43:1036 (1964)
104. Pappenheimer, A.M.Jr.: Valence of antibodies v Pappenheimerjevi: The nature and the significance of the antibody response. Columbia University Press 1953.
105. Kunkel, H.G., Tan E.M.: Autoantibodies in disease.
Adv.Immun. 4:351 (1964)
106. Good R.A., Rotstein J.: Progress in Allergy, 6:187 (1962)
107. Thorbecke G.J., Gordon H.A., Westman B., Wagner, M., Reyniers J.A.
J.inf.Dis. 101: 237 (1957).
109. Mellors R.C., Korngold, L.J.:
Expt.Med. 118:387 (1963)
110. Gowans, J.L.:
Proc. Royal Soc. London. V tisku.
111. Schooley, J.C.: Autoradiographic observations in plasma cell formation.
J.Immunol. 86:331 (1961)
112. Taliaferro, W.H., Jaroslaw, B.N.:
The restoration of hemolysin formation in X-ray rabbits by nucleic acid derivatives and antagonists of nucleic acid synthesis.
J.inf.Dis. 107:341 (1960)
113. Dutton, R.W., Dutton, A.G., Vaughan, J.H.:
The effect of 5-bromouracil desoxiriboside in the synthesis of antibodies in vitro.
Biochem.J. 75:230 (1960)
114. Nossal, G.J.V.: Further elaboration of the clonal deletion theory. referat na kongresu o imunotoleranciji, Locarno, 1965.

115. Sell S., Fahey, J.L.: Metabolism of gamma globulins in germ-free mice. V tisku.
116. Cohen, S.: Gamma globulin metabolism. Brit.Med. Bull. 19:202 (1964)
117. Benaceraf B., Sebastyen, M., Cooper, N.S.: The clearances of antigen-antibodies complexes from the blood by the reticulo-endothelial system. J.Immunol. 82:131 (1959)
118. Soons, J.B.J., Westerbrink, H.G.K.: Bull.Soc.Chim.Biol. 40:1803 (1958)
119. Cohen, S., Gordon, A.H., Mathews C.M.E.: Catabolism of the gamma globulin by the perfused isolated rat liver. Biochem.J. 82:197 (1962)
120. Freeman, T., Gordon, A.H., Humphrey, J.H.: Distinction between catabolism of native and denatured proteins by the isolated perfused liver after carbon loading. Brit.Jour.exp.Path. 39:459 (1958)
122. Dobson, E.L., Jones, H.B.: The behaviour of intravenously injected particulate material. Acta med.Scand. 144: 273 (1952). Supplementum.
121. Vetter et al.: The disappearance rate of colloidal gold from the circulation. J.Clin.Inv. 33 (1954)
123. Benaceraf, B. in drugi: A study of the phagocytic activity of the RES toward heat treated serum albumin tagged with J-131. Res.Bull. 2:19 (1956)
124. Erjavec, M., Vakselj, M., Cevc, P., Snajder, J., Flavsak, M.: Razvoj topografske detekcije primarnih tumorjev in metastaz s pomocjo radioaktivnih izotopov. II. Delo za sklad B.Kidrica (1964).
125. Taplin, G.V. in drugi: Reticuloendothelial function in man. Isotope in Klinik und Forschung, 5. Bd. Urban in Schwarzenberg (1963).

126. Taplin G.V. et al.: Organ visualisation by photo-scanning. Symp. on Med. Rad. Scanning, 1964.
127. Valentine, R.C.: Nature 184: 1838 (1959)
128. Dietrich, F.M. (Ciba, Basel) osebno
129. Gitlin D., Borges, W.H.: Studies on the metabolism of fibrinogen in two patients with congenital afibrinogenemia. Blood 8:679 (1953)
130. Sternlieb J., Morell, A.G., Tuckes, W.D., Greene, M.W., Scheinberg, J.H.: The incorporation of copper into ceruloplasmine. J. Clin. Inv. 40:1834 (1961)
131. Solomon A., Waldman, T.A., Fahey, J.L.: Metabolism of normal 6,6S gamma globulin in normal subjects and patients with macroglobulinemia and multiple myeloma. J. Lab. Clin. Med. 62:1 (1963)
132. Fahey, J.L., Robinson, A.G.: Factors controlling serum gamma globulin concentration. J. Exp. Med. 118:845 (1963)
133. Bartter, F.C., Steinfeld, C.J., Waldman, T., Uelea C.S.: Metabolism of infused serum albumin in the hypoproteinemia of gastrointestinal protein loss and in analbuminemia. Trans. Ass. Amer. Phycns 74: 180 (1960)
134. Müller-Eberhart H.J., Kunkel, H.C.: Clin. Chem. Acta 4:252 (1959)
135. Porath, J.: Biochim. et Biophys. Acta 22:151 (1956)
136. Gelotte, B., Flodin, P., Killander, J.: Fractionation of human plasma proteins by gel filtration and zone electrophoresis or ion-exchange chromatography. Arch. Bioch. Biophys., Suppl. 1:319 (1962)
137. Heide, K., Haupt, H., Schmidtberger: Behringwerke Mitteilungen 37:29 (1959)
138. Müller-Eberhard, H.J., Kunkel, H.G., Franklin, E.C.: Proc. Soc. exp. Biol. Med. 93:146 (1956)

139. Edelman, G.M., Kunkel, H.G., Franklin, E.C.:
Interaction of rheumatoid factor with antigen-antibodies complexes and aggregated gamma globulin
J.Exp.Med. 108:105 (1958)
140. Schultze, H.E., Haupt, H., Heide, K., Mösclin, G.,
Schmidtberger, R., Schwick, G.:
Untersuchungen über Gamma Makroglobuline des
menschlichen Serums.
Zeitschrift für Naturforschung, 17Bd:Heft 5:313(1962)
141. Lospalluto, J., Chegorianky J., Lewis, A., Ziff, M.:
Chromatographic ~~XXXXXXXXXX~~ properties of gamma
globulin. Behaviour of serum macroglobulin.
J.Clin.Inv. 39:473 (1960)
142. Albert, A., Johnson, P.; Macroglobuline I.
Studies on the isolation and physical properties
of pathological macroglobulins.
Biochem.J. 81:658 (1961)
143. Dextran Gels and their application in Gel filtration.
Pharmacia, Uppsala, Sweden.
144. Flodin, P., Killander, J.: Fractionation of human
serum proteins by gel filtration.
Bioche. et Biophys. Acta 63:403 (1962)
145. Spiegelberg, H.L., Weigle, W.O.:
The catabolism of homologous and heterologous 7S
gamma globulin fragments.
J.Exp.Med. 121 :223 (1965)
146. Spector, W.G.: The reabsorption of labelled proteins
in normal and nephrotic rat kidney.
J.path. and bact. 68:187 (1954)
147. Franklin, E.C., Ovary Z.: On sensitizing properties
of some normal and pathological human immunoglobu-
lins and fragments obtained by papain or pepsin
digestion.
Immunology 6:434 (1963)
148. Brambell, F.W.R., Hemmings, W.A., Oakley C.L., Porter, R.R.:
The relative transmission of the fraction of papain h
hydrolysed homologous gamma globulin from the uterine
cavity to the foetal circulation of the rabbit.
Roy.Soc.London Series B, 151:434 (1963)

XIII

149. Mc Farlane , A.S.: Metabolism of plasma proteins.
v Mammalian Protein Metabolism, Ed.Munroe+Allison,
Academic Press, 1964
150. Sterling, K.J.:
J Clin. Inv. 30: 1228 (1950)



C00155 3042300

NARODNA IN UNIVERZITETNA
KNJIZNICA



0000043799

