

*ВЕЛЛО ПИХЕЛГАС, ИЛБО МЕСИПУУ*

## СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ ГАММА-*G*-ГЛОБУЛИНА ЛИМФЫ И КРОВИ ОВЕЦ МЕТОДОМ УЛЬТРАЦЕНТРИФУГИРОВАНИЯ

В научной литературе накопилось значительное количество данных о получении и свойствах одного из основных иммунологических белков — гамма-*G*-глобулина. Как правило, этот важнейший вид иммуноглобулинов выделяется из плазмы или сыворотки крови человека или животных. Недавно в Институте экспериментальной биологии АН ЭССР в секторе физиологии животных этот белок был выделен еще из центральной лимфы грудного протока овец (Месипуу, Эомойс, 1971) с использованием при этом стандартной методики — низкотемпературного спиртового фракционирования (Nichol, Deutsch, 1948). При этом было отмечено, что между препаратами глобулинов, полученными при строго идентичных условиях из крови и лимфы, имеется внешнее различие. Выделенный из лимфы глобулин представляет собой белые прозрачные кристаллы, в то время как выделенный из крови препарат имеет заметный розовый оттенок. Растворимость высушенных в вакууме при температуре  $-5^{\circ}\text{C}$  препаратов глобулина в буферных растворах является также различной: препараты из крови растворяются заметно хуже, чем препараты из лимфы.

Результаты, полученные с помощью вертикального электрофореза в полиакриламидном геле (Месипуу и др., 1972), показали, что фракции гамма-*G*-глобулина лимфы оказались более четкими и разграниченными по сравнению с соответствующими фракциями гамма-глобулина плазмы крови. Все это приводит к мысли о сравнительно большей микрогетерогенности выделенных из крови препаратов по сравнению с препаратами, выделенными из лимфы.

Для того чтобы судить о чистоте препаратов, а также для дальнейшего выявления возможных различий между обоими типами препаратов, мы решили провести их сравнительный седиментационный анализ в аналитической ультрацентрифуге. Поскольку в литературе отсутствуют данные о свойствах глобулинов, выделенных из лимфы, авторы надеются, что определение основных физико-химических констант частично восполнит этот пробел.

### Методика

Выделение препаратов гамма-*G*-глобулина из проб плазмы крови и лимфы овец методом низкотемпературного спиртового фракционирования описано ранее (Месипуу, Эомойс, 1971).

Высушенные в вакууме при температуре  $-5^{\circ}$  кристаллические препараты гамма-глобулина плазмы крови и лимфы растворялись в 0,05*M* фосфатном буфере (рН 8,6) в равных количествах (5 мг/мл) и исследовались попарно в ультрацентрифуге. Для

определения коэффициентов диффузии и молекулярных весов требовалась предварительная очистка исследуемых растворов в препаративной ультрацентрифуге Vac-60 при скорости вращения «бакит-ротора» 36 000 об/мин в течение 1 ч.

Все опыты проводились в аналитической ультрацентрифуге «Спинко» (модель E, фирмы «Бекман», США). Для работы использовалась «шлиреновская» оптическая система с фазовой пластинкой. Ультрацентрифуга снабжена приспособлениями для регулировки и поддержания температуры и скорости вращения ротора.

Коэффициенты седиментации исследуемых растворов определялись методом скорости седиментации. Опыты проводились в стандартных ячейках с алюминиевыми вставками, имеющими угол сектора  $4^\circ$  при температуре ротора  $20^\circ$ . Применялся ротор Ap-D, скорость вращения которого составляла 60 000 об/мин. Снимки были сделаны через равные промежутки времени (8 мин). Измерения расстояний на фотопластинке проводили на микрокомпараторе «Мир-12». Для вычисления коэффициентов седиментации использовалось уравнение

$$S = \frac{2,303 (\lg r_2 - \lg r_1)}{\omega^2 (t_2 - t_1)},$$

где  $r_2$  и  $r_1$  — расстояния пиков от оси вращения ротора в моменты времени  $t_2$  и  $t_1$  соответственно, а  $\omega = 2\pi\nu$  — угловая скорость ротора. Наклоны прямых вычислялись с помощью метода наименьших квадратов. Коэффициенты седиментации приводили к стандартным условиям (температура воды  $20^\circ$ ) обычным способом (Шпикитер, 1964). За значение парциального удельного объема гамма-G-глобулина ( $\bar{V}$ ) брали 0,74 (Раип, 1963), вязкость растворителя измерялась с помощью вискозиметра Уббелюде (с временем истечения воды порядка 100 сек) в специальном термостатированном сосуде.

Коэффициент диффузии определяли в ультрацентрифуге в ячейке искусственного образования границы (капиллярного типа). Скорость вращения ротора доводили до 7200 об/мин, после образования пика скорость снижали на 2800 об/мин для предотвращения влияния седиментации на расширение пика. Фотографические снимки делали автоматически через 16 мин, продолжительность опытов была 80 мин. Полученные снимки увеличивали с помощью фотоувеличителя и переносили на миллиметровую бумагу.

Коэффициент диффузии вычислялся по уравнению

$$D = \frac{1}{4\pi t F^2} \left( \frac{A}{H} \right)^2,$$

где  $A$  — площадь под пиком,  $см^2$ ,  $H$  — максимальная высота пика,  $см$ ,  $F$  — общий фактор увеличения,  $t$  — время опыта,  $сек$  (для вычисления применяли промежутки времени  $\Delta t = t_{i+1} - t_i$ , где  $i = 1-4$ ).

Молекулярный вес вычисляли по формуле Сведберга

$$M = \frac{RT}{(1 - \bar{V}\rho)} \frac{S_{20,w}}{D_{20,w}},$$

где  $R$  — газовая постоянная и  $T$  — абсолютная температура. Молекулярный вес определялся также непосредственно методом неустановившегося равновесия (методом Арчибалда). Для этого 0,5%-ный препарат белка (после предварительной очистки) исследовался в аналитической ультрацентрифуге в двухсекторной ячейке с пластмассовой вставкой при скорости вращения ротора 6000 об/мин. Величину начальной концентрации белка  $c_0$  определяли в границеобразующей ячейке при скорости вращения ротора 7200 об/мин. Молекулярный вес вычислялся по уравнению

$$M = \frac{RTF}{(1 - \bar{V}\rho)\omega^2} \frac{\left(\frac{dc}{dr}\right)_M}{c_M r_M},$$

где  $\left(\frac{dc}{dr}\right)_M$  и  $c_M$  — градиент концентрации и концентрация белка у мениска, а  $r_M$  — расстояние от линии мениска до оси вращения. С помощью фотоувеличителя снимки на

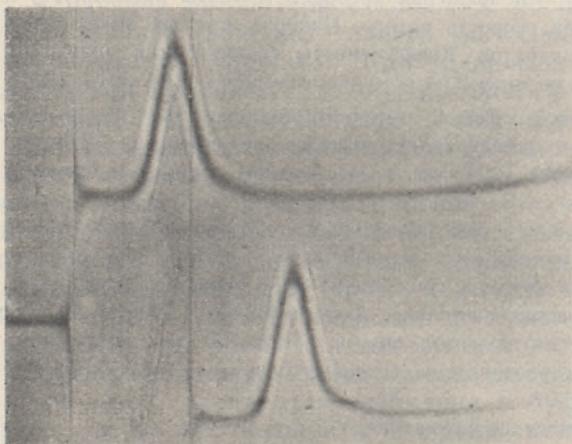
фотопластинках увеличивали на миллиметровую бумагу. Для определения  $c_M$  использовалось уравнение

$$c_M = c_0 - \int_{x_M}^{x_p} \left( \frac{dc}{dx} \right) dx,$$

где интеграл соответствует площади, ограниченной градиентной кривой, линией мениска и базальной линией. Применение подобного интеграла в уравнении для определения  $c_M$  вместо более сложного члена, содержащего вторые моменты координат (см. Klai-per, Kegeles, 1955), оправдано для условий нашего эксперимента: в течение всего опыта соблюдалось требование Чарлвуда  $2\omega^2 st < 0,005$  (Charlwood, 1957).

## Результаты

Типичные седиментационные диаграммы гамма-G-глобулина плазмы лимфы и крови овец представлены на рисунке.



Седиментационные диаграммы препаратов гамма-G-глобулина, выделенных из центральной лимфы (вверху) или крови (внизу) овец. Направление седиментации — слева направо. Скорость вращения ротора 60 000 об/мин. Снимок сделан через 28 мин после достижения полной скорости.

Препараты, выделенные из лимфы, были практически гомогенные: на снимках наблюдался один симметричный 6,5 S пик (рисунок, вверху). Лишь в некоторых препаратах обнаружались следы быстро седиментирующего компонента, но в недостаточном для оценки S количестве. Присутствие тяжелого компонента с коэффициентом седиментации около 9—10 S оказалось заметным для препаратов из крови. Количество этого компонента достигало 1—6% (рисунок, внизу).

Определение коэффициентов седиментации проводилось с десятью

препаратами гамма-G-глобулина овец. Препараты глобулинов лимфы и крови исследовались в ультрацентрифуге одновременно. Результаты определений приведены в табл. 1. Как видно из табл. 1, разница между

Таблица 1

Коэффициенты седиментации препаратов гамма-G-глобулина крови и лимфы овец

|                            | Определения |      |      |      |      | среднее |
|----------------------------|-------------|------|------|------|------|---------|
|                            | 1           | 2    | 3    | 4    | 5    |         |
| $S_{20,w}$ глобулина крови | 6,63        | 6,51 | 6,68 | 6,51 | 6,63 | 6,59    |
| $S_{20,w}$ глобулина лимфы | 6,52        | 6,40 | 6,66 | 6,50 | 6,53 | 6,52    |

средними коэффициентами седиментаций лимфы (6,52 S) и крови (6,59 S) незначительна и трудно с уверенностью говорить о ее существовании. Тем не менее, бросается в глаза явная тенденция к увеличе-

нию коэффициентов седиментации препаратов глобулина, выделенных из крови. Применение статистического анализа (метода сопоставления пар) показывает, что при уровне вероятности 95% разницу между коэффициентами седиментации можно считать существенной, хотя следующий уровень достоверности (99%) наличия существенных различий в экспериментальных данных не подтверждает.

Были определены также коэффициенты диффузии и молекулярные веса исследуемых препаратов. Результаты суммированы в табл. 2, где сравниваются также экспериментальные и литературные данные.

### Обсуждение результатов

Согласно литературным данным, препараты гамма-G-глобулина, полученные с помощью низкотемпературного спиртового метода из плазмы крови человека, быка, лошади или кролика, кроме основного 7 S компонента, содержат 5—20% более тяжелого 10 S компонента (Oncley и др., 1947; Smith, Brown, 1950). Наши препараты гамма-глобулина из плазмы крови овец содержали этот компонент в незначительном количестве (1—6%), а в препаратах из лимфы отмечались лишь следы тяжелых примесей.

В литературе имеется множество мнений относительно сущности 10 S компонента. Предполагается, что этот компонент является димером двух 7 S частиц или молекулой гамма-глобулина с измененной формой, или вообще посторонним компонентом (Oncley и др., 1947; Smith, Brown, 1950; Cann и др., 1951) и т. д. Многие из этих предположений маловероятны. Например, иммунологические исследования показали, что 10 S частицы являются глобулинами, а не посторонними веществами (Jager и др., 1948). При стоянии лиофилизированных препаратов в течение 1—3 лет их седиментационные свойства не изменились (Smith, Brown, 1950). Наконец, 10 S компонент не может быть случайным загрязнением или свойственным лишь для отдельных препаратов компонентом в связи с тем, что присутствие его обнаружено в самых различных препаратах гамма-глобулина плазмы человека и животных, при условии выделения препарата спиртовым методом. При использовании же других методов выделения — осаждения солями (Mandy, Nisonoff, 1963), конвекционного электрофореза с последующей хроматографией на ионообменнике (Fahey, Horbett, 1959) или без нее (Cann и др., 1951) — удалось из крови получить практически гомогенные препараты, содержащие лишь 7 S компонент. На основании вышесказанного логично предполагать, что 10 S компонент представляет собой тот же глобулин, но в полимеризованном виде. Возникновение его, видимо, связано с методом выделения белка: при использовании менее жестких методов выделения присутствие этого компонента не наблюдается.

Присутствие ранее описанных некоторыми авторами медленно седиментирующих альбуминных фракций с коэффициентом седиментации около 4 S (Cann, 1953), а также быстрых 18—20 S компонентов (Cann и др., 1951) в наших препаратах, судя по седиментационным седиграммам, не обнаруживалось. Все же результаты определения молекулярного веса исходного (без предварительной очистки) препарата гамма-глобулина (около 300 000 дальтон) указывают на присутствие в нем тяжелых примесей.

Найденные значения для  $S_{20,w}$ ,  $D_{20,w}$  и  $M$  хорошо согласуются с литературными данными (табл. 2).

Создается впечатление, что между гамма-G-глобулинами, выделенными из крови и лимфы, существует определенное различие. Сущность

Таблица 2

## Некоторые физико-химические свойства гамма-G-глобулина

| Величина седиментации и диффузии | Экспериментальные данные |             | Литературные данные  |   |
|----------------------------------|--------------------------|-------------|--|---|
|                                  | из крови                 | из лимфы    | из крови   |   |
|                                  |                          |             | овец   | животных   человека   |
| $S_{20,w} \cdot 10^{13}$         | 6,59 ± 0,03              | 6,52 ± 0,04 | 6,4 (кролик) <sup>a</sup><br>6,8 (лошадь) <sup>b</sup><br>6,8 — 7 (бык) <sup>c</sup> | 6,56 <sup>d</sup><br>6,6 <sup>e</sup><br>7,1 <sup>f</sup>   |
| $D_{20,w} \cdot 10^7$            | 3,91                     | 3,86        |  | 3,81 <sup>g</sup><br>3,84 <sup>d</sup><br>3,99 <sup>f</sup> |
| $M \cdot 10^{-3}$                |                          |             |  |   |
| По <i>S</i> и <i>D</i>           | 159 ± 5                  | 159 ± 5     |  | 156 <sup>h</sup><br>158 <sup>i</sup><br>162 <sup>d</sup>    |
| По Арчибальду                    | 159 ± 3                  |             | 155 (кролик) <sup>j</sup>  |   |
| По седиментационному равновесию  |                          |             |  | 145 <sup>k</sup>  |

Примечание. *a* — Mandy, Nisonoff, 1963;  
*b* — Deutsch, Nichol, 1948;  
*c* — Smith, Brown, 1950;  
*d* — Cann, 1953;  
*e* — Fahey, Horbett, 1959;  
*f* — Pedersen, 1945;

*g* — Bridgeman, 1946;  
*h* — Oncley и др., 1947;  
*i* — Cann и др., 1951;  
*j* — Edelman, Poulik, 1961;  
*k* — Edmundson и др., 1970.

этого различия не ясна. Заманчиво предполагать, что при циркуляции в организме (лимфа-кровь) частицы гамма-глобулина, поступившие с лимфой в кровь, соединяются с какими-то низкомолекулярными веществами, т. е. являются как будто бы переносчиками их. Судя по розовому оттенку препаратов глобулина, выделенного из крови, эти низкомолекулярные вещества каким-то образом связаны с эритроцитами. В литературе встречаются данные о том, что синтезированный в селезенке гамма-глобулин связывается с мембранами эритроцитов (Najjar, 1970), известны также данные о взаимодействии гемоглобина и гаптоглобина с образованием комплексов (Guinaud и др., 1956) и т. д. Можно предположить изменение формы молекул в еще более сферическую, компактную сторону (увеличение коэффициентов седиментации и диффузии), но с некоторым уменьшением их стабильности (возникновение 10 *S* компонента при выделении препарата). Конечно, пока это лишь удобная рабочая гипотеза, требующая доказательств.

Можно привести и другие объяснения обнаруженных различий. Вполне возможно, что в лимфатических узлах синтезируется специфический, отличающийся по структуре и свойствам гамма-глобулин (Портер, 1964). Хотя увеличение коэффициента седиментации для препаратов глобулина, выделенных из крови, на 0,07 *S* статистически вероятно (см. табл. 1), такой же эффект могут вызвать любые систематические ошибки. Например, из-за плохой растворимости препаратов глобулина крови их действительные концентрации были несколько меньшими, чем для препаратов из лимфы, и можно было бы полагать, что увеличение коэффициентов седиментации вызвано этим обстоятельством. Однако наши предварительные опыты не выявили зависимости коэффициентов седиментации от концентрации в исследуемых пределах, что согласуется также с литературными данными (Smith, Brown, 1950).

Увеличение коэффициентов седиментации и диффузий препаратов гамма-G-глобулина из крови не может быть вызвано и содержанием в них небольшого количества 10 S компонента. Согласно общепризнанной теории Джонстон-Огстона, при наличии в растворе нескольких компонентов более быстрый компонент (в нашем случае 10 S компонент) может влиять на величину коэффициента седиментации основного компонента лишь в сторону его уменьшения.

Наконец, представляется желательным провести аналогичные опыты с препаратами глобулина, выделенными другими методами, позволяющими получить строго монодисперсный белок, а также искать новые подходы к выяснению возможных различий между исследуемыми препаратами глобулина, т. е. применить более чувствительные методы исследования.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Месипуу И., Пихелгас В., Эомойс М., 1972. Некоторые физико-химические свойства гамма-G-глобулина центральной лимфы и крови. В кн.: Транспортная роль лимфы в животном организме. Таллин.
- Месипуу И., Эомойс М., 1971. Гамма-G-глобулин из центральной лимфы овец. Изв. АН ЭССР. Биол. **20** (4) : 363.
- Портер Р., 1964. Гамма-глобулин и антитела. В кн.: Белки, плазма, гамма-глобулины и антитела. М. : 45—79.
- Шпикитер В. О., 1964. Методы исследования биополимеров с помощью аналитической ультрацентрифуги. В кн.: Современные методы в биохимии, т. I, ред. Орехович В. Н. М. : 5—37.
- Bridgeman W. B., 1946. The peptic digestion of human gamma globulin. J. Am. Chem. Soc. **68** : 857.
- Cann J. R., Brown R. A., Singer S. J., Shumaker J. B., Kirkwood J. G., 1951. Ultracentrifugal studies of gamma G globulins prepared by electrophoresis-convection. Science **114** : 30.
- Cann J. R., 1953. Ultracentrifugal properties of human gamma G globulins prepared by electrophoresis-convection. J. Am. Chem. Soc. **75** : 4213.
- Charlwood P. A., 1957. Transactions Faraday Soc. **53** : 871.
- Deutsch H. F., Nichol J. C., 1948. Biophysical studies of blood plasma proteins. 10. Fractionation studies of normal and immune horse serum. J. Biol. Chem. **176** : 797.
- Edelman G. M., Poulik M. D., 1961. Studies on structural units of the gamma globulins. J. Exptl Med. **113** (5) : 861.
- Edmundson A. B., Wood M. K., Schiffer M., Hardman K. D., Ainsworth C. F., Ely K. R., 1970. A crystallographic investigation of a human IgG immunoglobulin. J. Biol. Chem. **245** (10) : 2763.
- Fahey J. L., Horbett A. P., 1959. Human gamma globulin fractionation on anion exchange cellulose columns. J. Biol. Chem. **234** (10) : 2645.
- Guinaud S., Tonnelat J., Boussier G., Jayle M. F., 1956. Bull. Soc. Chim. Biol. **38** : 329. Цит no: Wallenius G., Trautman R., Kunkel H. G., Franklin E. C., 1957. Ultracentrifugal studies of major non-lipid electrophoretic components of normal human serum. J. Biol. Chem. **225** (1) : 253.
- Jager B. V., Smith E. L., Nickerson M., Brown D. M., 1948. Immunological and electrophoretic studies on human gamma G globulins. J. Biol. Chem. **176** (3) : 1177.
- Mandy W. J., Nisonoff A., 1963. Effect of reduction of several of disulfide bonds on the properties and recombination of univalent fragments of rabbit antibody. J. Biol. Chem. **238** (1).
- Najjar V., 1970. The physiological role of the lymphoid system. Lymphology **1** (3) : 23.

- Nichol J. C., Deutsch H. F., 1948. Separation and purification of globulin from normal human plasma. *J. Am. Chem. Soc.* **70** : 80.
- Oncley J. L., Scatchard G., Brown A., 1947. Physical-chemical characteristics of certain of the proteins of normal human plasma. *J. Phys. Coll. Chem.* **51** (1) : 184.
- Pain R. H., 1963. The molecular weights of the peptide chains of gamma globulins. *Biochem. J.* **88** (2) : 234.
- Pedersen K. O., 1945. Ultracentrifugal studies on serum and serum fractions. Almqvist and Wiksells Boktryckeri AB.
- Smith E. L., Brown D. M., 1950. The sedimentation behaviour of bovine and equine immune proteins. *J. Biol. Chem.* **183** (1) : 241.

Институт экспериментальной биологии  
Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию  
15/11 1972

### VELLO PIHELGAS, ILBO MESIPUU

#### LAMMASTE LÜMFIST JA VEREST ERALDATUD GAMMA-G-GLOBULIINI OMADUSTE VÖRDLEV UURIMINE ULTRATSENTRIFUUGIMISE MEETODIL

##### Resümees

Lammaste tsentraalsest lümfist ja verest eraldatud gamma-G-globuliini preparaadid erinevad omavahel lahustuvuse, värvuse, kristallide kuju, 10 S-komponendi sisalduse jne. poolest. Analüütilisel ultratsentrifuugil «Spinco» E määrati mõlema preparaadi sedimentatsiooni põhilised karakteristikud. Verest eraldatud gammaglobuliini sedimentatsioonikoefitsient  $S_{20, w}$  osutus võrdseks 6,59 S-ga, difusioonikoefitsient oli  $D_{20, w} = -3,91 \cdot 10^{-7}$   $\text{cm}^2/\text{sek}$ . Molekulkaalu määramine Archibaldi meetodil ja arvutused Svedbergi valemi abil andsid ühe ja sama tulemuse — 159 000. Lümfist eraldatud preparaadil olid samad näitajad vastavalt 6,52 S,  $3,86 \cdot 10^{-7}$   $\text{cm}^2/\text{sek}$  ja 159 000. Erinevuste võimalike põhjuste kohta toimub mõttevahetus.

Eesti NSV Teaduste Akadeemia  
Ekspérimentaalbioloogia Instituut

Toimetusse saabunud  
15. 11 1972

### VELLO PIHELGAS, ILBO MESIPUU

#### COMPARATIVE ULTRACENTRIFUGAL STUDIES OF OVINE GAMMA G GLOBULINS ISOLATED FROM LYMPH AND BLOOD

##### Summary

The samples of ovine gamma G globulin isolated from central lymph and blood seem to show certain differences in solubility, colour, form of crystals, content of 10 S component, etc. The main properties for both kind of samples were determined in the analytical ultracentrifuge "Spinco" E. Experiments with ovine blood globulin yielded the sedimentation coefficient  $S_{20, w} = 6.59$  S, and the diffusion coefficient  $D_{20, w} = -3.91 \cdot 10^{-7}$   $\text{cm}^2/\text{sec}$ . From these figures, the molecular weight of 159,000 was calculated, in agreement with the results of Archibald measurements. The equivalent figures for the samples isolated from lymph were found to be 6.52 S,  $3.86 \cdot 10^{-7}$   $\text{cm}^2/\text{sec}$  and 159,000, respectively. Possible reasons of differences are discussed.

Academy of Sciences of the Estonian SSR,  
Institute of Experimental Biology

Received  
Feb. 15, 1972