

15. Hässig, A.; Montandon, R. und Plüss, H. R.: Klin. Wschr. 33: 259-264 (1955).
16. Moureau, P.: Bull. Acad. roy. Méd. Belg. 16: 78 (1951).
17. Jossa, P.: Rev. méd. Liège 7: 257-260 (1952).
18. Balgairies, F. et Christiaens, L.: C. R. Soc. Biol. 127: 31 (1937).
19. Id.: C. R. Soc. Biol. 128: 1146 (1938).
20. Ervin, D. M.; Christian, R. M. et Young, L. E.: Blood 5: 553-567 (1950).
21. Dausset, J. et Vidal, G.: Sang 22: 478-489 (1951).
22. André, R.; Salmon, C. et Dreyfus, Y.: Recherche sur les causes d'immunisation contre l'antigène A. Rev. Hémat. 7: 604-615 (1952).
23. Id.: 5^e Congrès int. Transf. Sang., Paris 1954, p. 535-537 (Paris 1955).
24. Farr, A. D.: Vox Sang. 2: 417-421 (1957).

Primi tentativi per la dimostrazione di iso-anticorpi anti-eritrociti negli estratti, variamente preparati, di eritrociti umani

G. BILE, A. CAJANO, R. CARACAUSI, MATILDE DURANTE
E M. NICOLETTI
Napoli, Italia

Le ricerche che formano oggetto della presente comunicazione sono fondate sulla ipotesi da noi prospettata al VI Congresso della Società Internazionale della Trasfusione del Sangue del 1956 a Boston¹ per la interpretazione del meccanismo di formazione dei gruppi sanguigni e della sierogenesi delle iso-agglutinine alfa e beta.

In base a questa ipotesi la legge di *Bernstein* riguardante la ereditarietà dei geni *A*, *B* e *R* nei globuli rossi verrebbe da questi spostata alle cellule formatrici di anticorpi, mentre gli eritrociti sarebbero sempre caratterizzati dalla presenza dei due antigeni celluloso-specifici *A* e *B*.

La presenza dell'uno o dell'altro o di entrambi questi due antigeni o la assenza di essi nelle cellule anticorpopoietiche condizionerebbe, attraverso un meccanismo di auto-immunizzazione fisiologica, la caratterizzazione del gruppo sanguigno, nel senso cioè che le suddette cellule anticorpopoietiche verrebbero sollecitate a produrre l'anticorpo specifico per l'antigene presente nell'eritrocito e di cui esse mancano (vedi schema; tab. I).

Con questa ipotesi hanno una certa connessione le ricerche di *Sander*² il quale avrebbe constatato che nei feti umani lunghi dai 3 ai 16 cm gli eritrociti sono panagglutinabili (*panagglutinazione fetale di Sander*), nei feti lunghi dai 16 ai 23 cm

Tabella I

Ipotesi dell'auto-immunizzazione fisiologica nella interpretazione dei gruppi ABO

Cellule formatrici di anticorpi	Antigeni in eritrociti	Anticorpi evocati	Gruppo	Agglutinine nel siero
AB	AB	—	AB	—
A	AB	anti-B	AB β (A)	β
B	AB	anti-A	AB a (B)	a
—	AB	anti-A anti-B	Aa B β (O)	$a-\beta$

tutti o quasi tutti gli eritrociti sono di gruppo AB e nei feti lunghi dai 23 cm in su gli eritrociti sono distinguibili secondo i quattro gruppi classici.

Il Sander definisce tale processo di caratterizzazione del gruppo a partire da una determinata epoca della vita fetale «*eliminierende Differenzierung*».

Altre connessioni, sebbene meno dirette, si intravedono con le vecchie esperienze di Robertson e Rous³, i quali negli estratti di eritrociti di coniglio hanno posto in evidenza un potere isoagglutinante sugli eritrociti stessi.

E ci piace anche ricordare le ricerche della Filitti-Wurmser e coll.⁴ i quali hanno dimostrato che le agglutinine β hanno un diverso peso a seconda dei genotipi di provenienza e che le stesse agglutinine β e le a , posseggono caratteristiche termodinamiche diverse secondo il genotipo.

In questa sede noi desideriamo esporre i diversi tentativi compiuti allo scopo di evidenziare negli estratti eritrocitari, ottenuti da globuli rossi interi o da stromi, gli iso-anticorpi a e β , che secondo il nostro presupposto teorico avrebbero dovuto essere presenti e così distribuiti: gli a e β nei globuli O, gli a nei globuli B, i β nei globuli A, mentre avrebbero dovuto essere assenti nei globuli AB.

Abbiamo seguito due direttive principali:

- dimostrazione degli iso-anticorpi;
- dimostrazione degli iso-antigeni: A nei globuli B e O; B nei globuli A e O; A e B nei globuli O.

Le prove immunologiche sono state eseguite a temperatura ambiente, a +4°, a +37°, in mezzo salino, proteico e con siero antiglobuline su eritrociti test papainizzati e non.

Le ricerche sono state condotte su globuli rossi, ovvero su stromi integri o su sostanza stromale, ottenuti per emolisi da acqua distillata, con il metodo di Howe, con acido acetico, nonchè su globina purificata e liofilizzata (v. tab. II).

I° Gruppo di ricerche (metodi chimici)

a) Preparati gli stromi con acido acetico o con acqua distillata, questi sono stati trattati o con acido tricloroacetico al 20 %, o con alcool assoluto, o con solfato di

Tabella II

1° gruppo (met. chimici)	2° gruppo (met. immunologici)	3° gruppo (met. fisici)	4° gruppo
a) precipitazione con acido tricloroacetico al 20%, con alcool assoluto, con solfato di magnesio al 33%	a) eluzione di eritrociti papainizzati e agglutinati da antisieri incompatibili	a) eluzione a 56° per dieci minuti	a) flussoforesi
b) tecnica di <i>Greenwalt</i>	b) eluzione di eritrociti sensibilizzati con siero anti-H c) assorbimento di eritrociti con siero compatibile e successiva titolazione del siero assorbito	b) rottura degli stromi con ultrasuoni	b) ricerche sulla globina

ammonio al 33%. Si è così ottenuto un precipitato che in soluzione fisiologica non si è ridisciolto nonostante che sia stato sottoposto precedentemente a dialisi. Questo materiale pertanto non è stato impiegato per le prove immunologiche.

b) Abbiamo anche seguito la tecnica di *Greenwalt*⁵ per la eluzione di anticorpi dagli stromi eritrocitari. Nell'eluato da stromi così ottenuti non si sono evidenziate proprietà iso-anticorpali α e β .

II° Gruppo di ricerche (metodi immunologici)

a) Eritrociti papainizzati sono stati agglutinati da iso-sieri di gruppo incompatibile e quindi eluiti. L'eluato è stato poi cimentato con gli eritrociti test. I risultati sono stati negativi. Tali ricerche sono scaturite dal presupposto teorico che nell'eluato di globuli rossi papainizzati e poi agglutinati da isosieri incompatibili, potesse essere svelato l'altro iso-anticorpo (anti-B nei globuli A, ad esempio).

b) Fondandoci su questo stesso presupposto teorico, abbiamo anche sensibilizzato globuli rossi umani con siero anti-H (siero di anguilla) e quindi abbiamo eluito. Negli eritrociti così trattati, ricimentati con i sieri test, non abbiamo osservato alcuna variazione antigenica.

c) Con i metodi di assorbimento, trattando eritrociti di ciascun gruppo con sieri di gruppo compatibile e quindi ricimentando questi sieri con eritrociti test, non abbiamo potuto documentare alcuna variazione di titolo, che avremmo teoricamente potuto osservare se l'anticorpo presente nell'antisiero si fosse legato all'antigene eventualmente presente negli eritrociti.

III° Gruppo di ricerche (metodi fisici)

In questo gruppo rientrano sia i semplici procedimenti di eluzione a 56° per 10 minuti su globuli rossi interi e su stromi, sia i tentativi di rompere gli stromi con

ultrasuoni ed ottenere quindi degli estratti da cimentare poi con gli eritrociti test. Per il primo punto le ricerche hanno dato risultato negativo; per il secondo è ancora prematuro giungere a conclusioni definitive.

IV^o Gruppo di ricerche

Su globina umana purificata e liofilizzata non ci è stato possibile dimostrare antigeni di nessun gruppo, mentre la dimostrazione di proprietà iso-anticorpali α e β ha dato dei risultati dubbi che dovranno essere approfonditi e che per ora ci limitiamo appena ad accennare.

Inoltre, a completamento delle metodiche finora descritte, abbiamo iniziato altre ricerche con la flussoforesi, nella ipotesi che la concentrazione delle frazioni proteiche isolate da estratti di globuli rossi o da stromi potesse meglio servire per la evidenziazione delle proprietà iso-anticorpali. Allo stato abbiamo trattato con flussoferesi, sia emolisati da acqua distillata, sia estratti acquosi di stromi liofilizzati. Per i primi siamo riusciti ad ottenere 4 o 5 frazioni proteiche che però non hanno rivelato iso-anticorpi α e β , per i secondi non abbiamo isolato nessuna frazione, per cui riteniamo che vada perfezionata la tecnica di estrazione.

Ovviamente ci rendiamo conto delle difficoltà di queste ricerche, in quanto se la nostra ipotesi è esatta, il meccanismo della sierogenesi delle iso-agglutinine risulterebbe un fenomeno dinamico con continua formazione di complessi anti-gene-anticorpo.

Da quanto sopra si desume pertanto che i tentativi finora fatti non sono stati coronati da risultati probativi nei riguardi di quanto volevamo verificare. Poiché però riteniamo che le tecniche e le metodiche impiegate debbano essere perfezionate ed estese, continueremo ad approfondire le ricerche sulla nostra ipotesi di lavoro, la quale è l'unica che consente di spiegare un fatto a prima vista inconciliabile con la dottrina immunologica classica: la mancanza cioè delle agglutinine incompatibili ovvero anche la costanza delle agglutinine compatibili, come si esprime il *Doerr*⁶, in presenza, ovvero in assenza dei rispettivi antigeni.

Summary

On the basis of the working hypothesis of serogenesis of α - and β -agglutinins and of the characterization of the group by means of an auto-immune mechanism, researches were carried out to demonstrate the presence of anti-erythrocyte iso-antibodies in human red cells.

These studies were performed on red cells, on whole stromata or on stromal substance, obtained by hemolysis with distilled water, according to *Howe's* method, or by acetic acid treatment.

Two main purposes were aimed at:

- a) demonstration of anti-erythrocyte isoantibodies;
- b) detection of isoantigens A and B in red cells B and A and in red cells O, respectively.

The possible isolation of antibodies from erythrocytes was attempted by physical (heat), chemical (trichloroacetic acid, ammonium sulfate, alcohol) and serological methods (isoantibody activity of the eluate of erythrocytes treated with anti-H sera and isosera). The protein solutions thus obtained were tested for their agglutinating and blocking power with known test blood cells.

However, no probative results were obtained.

To reveal the presence of isoantigens A and B in erythrocytes of groups B and A respectively (or in erythrocytes O), these were treated with enzymes. The presence of such isoantigens was also tested in red cells and in stromata undergoing the treatment mentioned above for separation of antibodies.

Their possible agglutinability, the property of fixing incomplete antibodies, and the fall in titre of serum placed in contact with them were also examined. The preliminary studies along such lines have, on the whole, given no indicative results.

Further studies are in progress to perfect some of the methods mentioned and to investigate the possible isoantibody capacity of various fractions obtained by continuous flow electrophoresis of erythrocyte extracts or of erythrocyte stromata prepared in different ways.

Bibliografia

1. *Cajano, A.; Bile, G.; Caracausi, R.; Durante, M.; Morgera, P.; Nicoletti, M. and Santoro, E.:* Serogenesis of alpha and beta-iso-agglutinins: a new working hypothesis based on auto-immunization. Proc. 6th Congr. int. Soc. Blood Transf., Boston 1956 (Karger, Basel/New York 1957).
2. *Sander, F.:* Serologische und morphologische Blutentwicklungen. Zbl. Bakt. I Orig. 160: 403 (1955).
3. *Robertson, O. H. and Rous, P.:* Sources of the antibodies developing after repeated transfusions. J. exp. Med. 35: 141 (1922).
4. *Filitti-Wurmser, S.; Jacquot-Armand, Y. et Theoleyre, M.:* Sur les isohémagglutinines anti-A naturelles ou provoquées par immunisation. Rev. Hémat. 13: 295 (1958).
5. *Greenwalt, T. J.:* A method for eluting antibodies from red cell stromata. J. Lab. clin. Med. 48: 636 (1956).
6. *Doerr, R.:* Die Immunitätsforschung. Vol. IV/2 (Springer, Wien 1949).