Separazione cromatografica su colonna di proteine eterogenee

G. VIVALDI

Laboratori di Biologia, Istituto Superiore di Sanità, Roma, Italia

Lo studio della struttura e della funzione di una proteina presuppone l'isolamento e la purificazione di essa per liberarla dalle sostanze non proteiche e da altre proteine che sono presenti nel materiale di partenza. A parte questa considerazione, è inoltre da tener presente che in alcuni casi è necessario frazionare ulteriormente la proteina pura quando questa si presenti eterogenea ; basta solo ricordare a titolo di esempio un caso tipico : quello della emoglobina che in quasi tutti gli animali presenta una eterogeneità di maturazione ed una eterogeneità per presenza contemporanea di componenti normali minori, ed anche, in casi patologici, una eterogeneità genetica nei soggetti eterozigoti. Una simile eventualità può inoltre verificarsi nelle preparazioni enzimatiche purificate, per la presenza di isoenzimi.

L'applicazione dei metodi cromatografici su colonna rappresenta una delle tecniche più convenienti per ottenere sia in fase analitica che preparativa la purificazione e la separazione nei suoi componenti del materiale proteico.

Una tradizionale classificazione dei metodi cromatografici li distingue in metodi di cromatografia per adsorbimento, per partizione e per scambio ionico, intendendosi per cromatografia di adsorbimento quella basata sulla diversa capacità di distribuzione di un soluto fra un solvente ed una fase solida ; per cromatografia di partizione quella basata sulla ripartizione del soluto tra due fasi liquide, una stazionaria ed una mobile ; ed infine per cromatografia a scambio ionico quella basata sulle variazioni di affinità del soluto per una fase stazionaria rappresentata essenzialmente da acidi o basi altamente insolubili, dovute a variazioni delle condizioni fisico-chimiche del sistema. È bene dire subito che se si fa eccezione per il gel-filtraggio, che alcuni classificano fra i metodi di cromatografia di partizione, quest'ultima è stata solo scarsamente applicata alla separazione delle proteine a causa di alcune difficoltà sperimentali rappresentate dal pericolo della denaturazione di esse nei solventi organici ed alla interfacie e dalla scarsa solubilità delle proteine, specialmente a bassa temperatura, nei solventi che vengono generalmente adoperati per questo metodo.

Ann. Ist. Super. Sanità (1966) 2, 163-186.

Tuttavia è necessario sottolineare che una classificazione di questo tipo, basata sulla natura della fase stazionaria e sui tipi di forze che sono responsabili degli scambi fra le due fasi, pur essendo conveniente, è arbitraria poichè in ben pochi metodi cromatografici agisce uno solo di questi meccanismi, e si può tutt'al più affermare, che in un determinato caso un meccanismo predomina sugli altri. Pertanto le considerazioni, del resto molto generali, che verranno fatte sulla separazione cromatografica su colonna delle proteine, possono venire riferite a qualsiasi tipo di cromatografia.

Poichè il materiale proteico presenta delle caratteristiche differenti dagli altri soluti che creano dei particolari problemi di separazione, solo in un'epoca relativamente recente è stato possibile sviluppare dei metodi soddisfacenti per la cromatografia delle proteine. I problemi cui si è accennato derivano dalla natura delle proteine che sono delle macromolecole polielettrolitiche aventi struttura molto labile.

L'elevato peso molecolare e la forma asimmetrica di molte molecole proteiche influenzano notevolmente l'equilbrio di molti soluti proteici tra le fasi durante il processo di separazione cromatografica ; come conseguenza di questo fatto le costanti di diffusione sono molto piccole e quindi la velocità di trasferimento dei soluti proteici nell'interfacie delle fasi è generalmente piuttosto ridotta ; anche la diffusione longitudinale sulla colonna è ridotta in maniera corrispondente, ma questo rappresenta un vantaggio piuttosto relativo poichè la diffusione longitudinale non rappresenta in genere un fattore limitante nei metodi cromatografici. La conseguenza pratica più importante che deriva da questa ridotta velocità di equilibrio tra le fasi è che la cromatografia delle proteine deve essere effettuata a velocità più basse di quelle che vengono generalmente usate per soluti di più basso peso molecolare ; inoltre, poichè è necessario operare a bassa temperatura per evitare la denaturazione del materiale, la velocità di equilibrio tra le fasi viene ulteriormente ridotta anche dall'aumento della viscosità del solvente.

Un secondo aspetto particolare, dipendente dalle dimensioni della molecola proteica, può essere rappresentato dall'effetto di filtraggio molecolare che può complicare il processo fondamentale di separazione. Infatti sia l'adsorbente solido che lo scambiatore di ioni o qualsiasi altra fase di supporto possono presentare dei pori con diametri di dimensioni paragonabili a quelle del soluto proteico : in questo caso il soluto con molecole più piccole entrerà nei pori mentre quello con molecole di maggiori dimensioni ne resterà escluso ; data l'assoluta indipendenza del meccanismo di frazionamento per adsorbimento o per scambio ionico da quello di filtraggio molecolare, la risoluzione cromatografica potrà essere migliorata o peggiorata a seconda dei casi. Inoltre nei casi in cui il diametro dei pori del supporto è superiore da tre a dieci volte a quello delle molecole del soluto, la penetrazione di queste nei pori diverrà irreversibile a causa del combinarsi delle forze di Van der Waals

e di altre forze di attrazione nell'interno dei pori, e ne conseguirà un minore ricupero del soluto. Per ovviare a questo inconveniente è opportuno che nella cromatografia delle proteine sia scelta una fase stazionaria che abbia o una struttura molto aperta che permetta un libero avvicinamento delle macromolecole ad una vasta superficie del supporto, o una struttura molto chiusa che impedisca l'entrata del soluto nei pori. Un esempio di fase stazionaria del primo tipo è data dalle cellulose, mentre il secondo tipo è rappresentato dalle resine sintetiche con un elevato numero di legami crociati.

Come è noto alla struttura terziaria delle proteine sono legate sia le proprietà biologiche che molte caratteristiche fisico-chimiche; è quindi di estrema importanza che la stabilità di questa struttura venga il più possibile mantenuta durante i processi di separazione.

Conseguenza della disorganizzazione della struttura terziaria è la denaturazione: se tale disorganizzazione è limitata, il processo di denaturazione può essere reversibile, ma quando questa supera un certo limite, che in genere è molto ristretto, un orientamento delle catene peptidiche sufficientemente corretto da permettere il ristabilirsi dei legami che erano stati rotti diviene talmente improbabile da impedire la reversibilità del fenomeno. Una delle conseguenze della denaturazione è la spiccata diminuzione della solubilità, che impedisce ovviamente il successivo svolgimento della separazione cromatografica. Sfortunatamente molti dei requisiti necessari per una buona separazione cromatografica favoriscono la denaturazione delle proteine: ad esempio per ottenere una buona cromatografia è necessario usare una fase stazionaria finemente divisa allo scopo di assicurare il rapido equilibrio tra le fasi aumentando il più possibile la superficie dell'interfacie. Si dà il caso che molte proteine vanno incontro ad una rapida denaturazione quando si trovano in strato monomolecolare all'interfacie; è quindi imperativo operare a basse temperature per ridurre questa labilità, anche se questa condizione influisce negativamente, come abbiamo visto, sulla separazione cromatografica. In molti casi è inoltre consigliabile l'uso di agenti antidenaturanti come l'n-acetiltriptofano, introdotto da Hausmann e Craig per la separazione in controcorrente, allo scopo di stabilizzare le molecole proteiche. Molto spesso può accadere che durante il procedimento di cromatografia avvengano delle reazioni chimiche che provocano la rottura di legami covalenti; ad esempio la rottura dei legami disolfuro, che si verifica in genere per ossidazione, fa aumentare di molto la probabilità di denaturazione poichè questi legami formano dei ponti rigidi che assicurano i reciproci rapporti fra le catene polipeptidiche; è quindi opportuno per prevenire questa possibilità, oltre che operare a bassa temperatura, aggiungere al solvente sostanze chelanti fra le quali la più diffusamente usata è l'EDTA (acido etilendiammino tetraacetico, o versene).

Tuttavia la differenza di gran lunga più importante fra il comportamento cromatografico delle sostanze a basso peso molecolare e quello delle

proteine deriva dalla natura polielettrolitica di queste ultime. Questa proprietà ha come conseguenza lo stabilirsi di legami multipli fra il soluto proteico ed i supporti sia nei sistemi di adsorbimento sia in quelli di scambio ionico.

Questa situazione presenta, come sempre, dei vantaggi e degli svantaggi; se da una parte l'esistenza di più di un legame fra il soluto e la fase stazionaria determina una notevole specificità sterica per il processo di ritenzione derivante dalla necessità di una corrispondenza piuttosto precisa fra i gruppi attivi del soluto ed i centri attivi del solvente, dall'altra lo stabilirsi di legami multipli rappresenta generalmente un ostacolo ad una buona separazione cromatografica poichè in questo caso i soluti tendono a presentare un rapporto di distribuzione fra le fasi molto alto o molto basso ed in genere il passaggio fra queste due situazioni estreme avviene in maniera piuttosto critica durante le variazioni di equilibrio del sistema.

A questo punto sembra opportuno riferire il trattamento teorico che Boardman e Partridge [1] hanno dato di questo problema nel caso specifico della separazione cromatografica delle proteine su resine carbossiliche a scambio ionico (Amberlite IRC 50), sia perchè questa teoria sembra poter essere estesa a qualsiasi caso nel quale la molecola proteica è in equilibrio con una molecola più piccola a livello di z siti attivi (o, in altre parole, la molecola proteica è z valente), sia perchè da questa teoria possono essere dedotte, come vedremo, delle utili conseguenze pratiche.

Se chiamiamo E la molecola dell'eluente, P la molecola proteica ed A la fase stazionaria, il loro equilibrio può essere notato così

$$zE + A_zP \rightleftharpoons zAE + P$$

e la costante di equilibrio K_z può essere espressa

$$K_z = \frac{C_{AE}^z \cdot C_P}{C_E^z \cdot C_{AzP}}$$

nella quale C_{AE} e C_{AzP} sono le concentrazioni dell'eluente e della proteina nella fase stazionaria e C_E e C_P le concentrazioni rispettive nella fase mobile. Nel momento nel quale la proteina viene completamente dislocata dalla fase stazionaria per azione dell'eluente, $C_{AE} = Q$, cioè la concentrazione dell'eluente nella fase stazionaria è uguale alla capacità di scambio della fase stazionaria e poichè il coefficiente di ritenzione del soluto è nei processi cromatografici inversamente proporzionale alla concentrazione dell'eluente, il coefficiente di ritenzione della proteina α_P è dato da

$$\alpha_P = \frac{Q}{C_E^z \cdot K_z}$$

dove K_z è una costante di equilibrio.

Analogamente il volume di ritenzione del soluto nel caso particolare del soluto proteico $\bar{V}_P$, è dato dall'equazione

$$\bar{V}_P - V_C = V_S \cdot \alpha_P$$

dove V_C è il volume della colonna e V_S il volume della fase stazionaria. Combinando le due ultime equazioni si ha che

$$\bar{V}_P - V_C = \frac{K}{C_E^z}$$

nella quale K è una costante caratteristica del particolare sistema cromatografico che si vuole esaminare.

La prima conclusione pratica che si può trarre da questo ragionamento risulta evidente dal grafico relativo all'ultima equazione per valori di z, cioè di valenza della molecola proteica, compresi fra 1 e 6 (Fig. 1). È facile dedurre che mentre per valori di $z = 1$, cioè per molecole del soluto che si legano in un solo sito attivo al supporto, la concentrazione della soluzione eluente

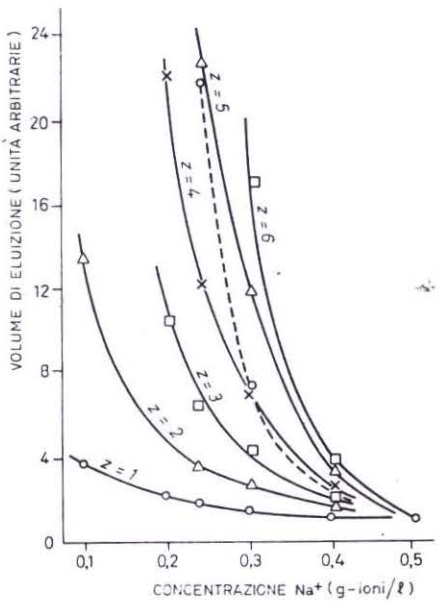

Fig. 1. — Cromatografia di proteine su resine carbossiliche acide a scambio ionico. Relazione fra il volume di eluizione e la concentrazione ionica dell'eluente per valori di z compresi fra $z = 1$ e $z = 6$ (z = siti attivi della proteina capaci di legarsi con la fase stazionaria). Riprodotta da (1).

non ha praticamente alcun effetto, per valori superiori a $z = 3$, C_E è determinante tanto che in una molecola che si leghi alla fase stazionaria in 5 siti, $z = 5$, l'aumento di 0,1 g/litro della concentrazione dell'eluente produce una diminuzione di 10 volte del volume di ritenzione. Infatti in molte separazioni cromatografiche di miscele proteiche l'eluizione viene effettuata con gradienti progressivamente crescenti nella concentrazione dell'eluente.

Inoltre, poichè α_P, cioè il coefficiente di ritenzione, è dipendente in modo critico dalla concentrazione dell'eluente C_E, è molto improbabile che un eluente

di composizione costante sia efficace nel provocare una buona separazione cromatografica di una miscela proteica: infatti il coefficiente di ritenzione e quindi il volume di ritenzione potranno avere un valore utile solo per uno o due soluti molto simili nelle loro proprietà chimico-fisiche mentre gli altri soluti saranno o molto debolmente trattenuti, con un R cioè il rapporto fra il tasso di mobilità del soluto ed il tasso di mobilità del solvente = 1, o molto fortemente trattenuti, con un R vicino a O. La cromatografia con solvente di composizione costante potrà essere utile solo in casi particolari come quello (Fig. 2) relativo alla separazione delle mioglobine di balena effettuata da Edmundson e Hirs ([2]) ma in questo caso si tratta della separazione di molecole proteiche aventi una struttura sia primaria che secondaria e terziaria molto simile differendo per la sostituzione di uno solo o due amminoacidi della catena peptidica.

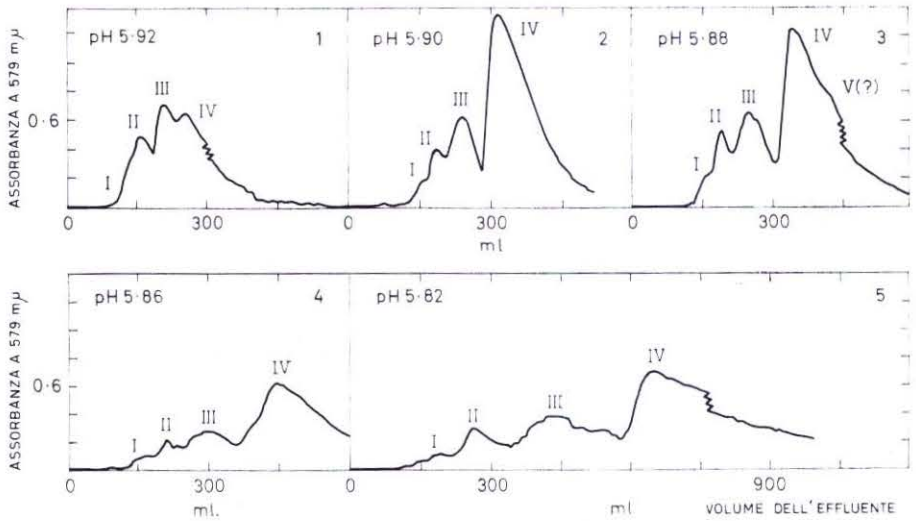

Fig. 2. — Separazione cromatografica dei cinque componenti della mioglobina di spermaceti eseguita su colonne di Amberlite IRC 50 con tamponi della stessa forza ionica ma di differente pH. Riprodotta da ([2]).

La spiccata dipendenza di α_P (coefficiente di ritenzione) dalle altre condizioni sperimentali fa presumere che la migliore eluizione delle proteine avvenga quando il loro R è molto prossimo al valore di uno, ed infatti i tentativi per ritardare il cammino delle zone proteiche attraverso la colonna, allo scopo di ottenere una migliore risoluzione, sono in genere destinati al fallimento a causa del formarsi di enormi code che sono in parte anche dovute a locali differenze di omogeneità del sistema cromatografico. Fortunatamente i valori critici di C_E ai quali il valore di R si avvicina ad uno

sono notevolmente differenti per le varie proteine, altrimenti la separazione cromatografica di esse sarebbe un'impresa disperata.

Come abbiamo visto, una buona separazione di una miscela di materiale proteico si ottiene usando una concentrazione crescente della soluzione eluente; in linea di principio non sembrerebbe avere molta importanza se l'aumento della concentrazione dell'eluente viene applicato in maniera discontinua e in maniera continua, ma in pratica si è constatato che esistono sensibili differenze fra i due casi. Infatti un gradiente molto lento ed in modo particolare del tipo convesso, produrrà un considerevole allargamento delle zone delle varie proteine, mentre un cambiamento discontinuo della sua concentrazione, quando questa venga portata ad un valore prossimo a quello critico di un soluto proteico, provocherà l'eluizione di questo soluto in una zona molto netta, tuttavia i soluti con un valore critico vicino saranno eluiti nello stesso momento. In conclusione il metodo del gradiente continuo presenta il vantaggio di una maggiore risoluzione a spese di una più evidente formazione di code, mentre il metodo del gradiente discontinuo darà luogo a picchi molto netti ed a buoni ricuperi del soluto a spese però della risoluzione e questo soprattutto quando i successivi cambiamenti della concentrazione dell'eluente siano fatti con intervalli piuttosto ampi. In genere è possibile affermare che quando si tratta di separare miscele proteiche piuttosto complesse molti ancora preferiscono l'uso di un gradiente discontinuo. Tuttavia anche dalla nostra esperienza è stato confermato che un gradiente continuo è molto utile nella separazione di componenti diversi di una stessa proteina o di uno stesso enzima.

Da quanto è stato detto deriva che la cromatografia di per se stessa non è un criterio sufficiente per giudicare della purezza di una proteina: la formazione di zone multiple, la contaminazione delle diverse zone con le code di zone adiacenti, possono suddividere una singola proteina in diverse parti del cromatogramma, come d'altra parte un gradiente piuttosto ripido o un gradiente discontinuo può comprimere molte zone proteiche adiacenti in un solo picco ben netto. Inoltre la debole forza ionica dell'eluente che a volte è necessaria nelle prime fasi di una separazione cromatografica spesso favorisce le interazioni fra differenti proteine, o magari, ma meno frequentemente, l'interazione fra i soluti proteici ed i costituenti del tampone presenti in bassa concentrazione: in ciascuno di questi casi si possono formare zone false che complicano il giudizio che si può dare della purezza delle proteine separate. Fra i molti metodi, come ad esempio l'elettroforesi o la ultracentrifugazione analitica delle proteine, che consentono un giudizio più preciso sulla purezza delle proteine separate, uno dei più semplici è ancora la ricromatografia delle singole zone nelle stesse condizioni sperimentali nelle quali si è svolta la cromatografia originale. La riproducibilità della eluzione, pur non costituendo una riprova definitiva della purezza delle proteine presenti nelle singole zone, rappresenta quanto meno una ottima evidenza sperimen-

tale che le zone isolate non sono dovute ad artefatti provocati dal metodo di separazione.

Una ultima considerazione da farsi è che, data la dipendenza del volume di ritenzione dalle condizioni sperimentali, è di estrema importanza che all'inizio dell'esperimento le fasi mobile e stazionaria siano in perfetto equilibrio: per ottenere delle condizioni di questo genere è necessario, ed importante, che le colonne siano sottoposte ad una equilibrazione che a volte può richiedere diversi giorni prima di essere completa.

Le tecniche di cromatografia di adsorbimento sono state largamente impiegate nella purificazione delle proteine. Come abbiamo già visto, i procedimenti di questo tipo implicano la concentrazione differenziale di sostanze solute sulla superficie di solidi opportunamente scelti e successivamente una eluizione differenziale. Parlando in generale i legami interessati nell'adsorbimento possono essere di diversi tipi; ionici, idrofobici e legami idrogeno, tuttavia nel caso particolare della cromatografia delle proteine, tutti i sistemi che sono stati applicati con successo operano soprattutto mediante l'intervento di legami idrogeno che legano il soluto all'adsorbente rappresentato, nella maggior parte dei casi, da scambiatori di ioni.

È appunto in base a questo concetto della prevalenza dei legami idrogeno nel meccanismo della cromatografia delle proteine che Sober, Peterson e coll. ([3]) hanno recentemente abbandonato la classica distinzione fra cromatografia di adsorbimento e cromatografia a scambio ionico e classificano fra gli adsorbenti, o fase stazionaria, della cromatografia delle proteine, insieme al gel di fosfati di calcio, anche le resine a scambio ionico, le cellulose a scambio ionico e gli scambiatori di ioni derivanti dai destrani.

Il gel di fosfato di calcio è divenuto disponibile per l'uso nella cromatografia su colonna solo da quando sono stati elaborati dei metodi per controllare le sue proprietà meccaniche, poichè precedentemente la estrema resistenza delle colonne impaccate con esso al flusso della soluzione acquosa impediva di generalizzare il suo uso. Molti tipi di proteine possono essere adsorbiti in maniera reversibile su gel di fosfato di calcio, anche sostanze con molecole di enorme grandezza, e quindi la sua utilità appare essere quasi generale. La sua capacità di adsorbire le proteine è nettamente superiore a quella delle resine organiche scambiatrici di ioni, probabilmente a causa della sua struttura largamente aperta di gel idrofilo. D'altra parte però questo gel è meno stabile, dal punto di vista fisico, di altri adsorbenti usati nella cromatografia delle proteine. I legami fra il soluto e il gel di fosfato di calcio implicano anche forze ioniche e la eluizione viene effettuata, come negli altri sistemi cromatografici, mediante cambiamenti della concentrazione salina o del pH del solvente. A questo proposito c'è da osservare che l'ordine nel quale un gruppo di proteine emerge da una colonna di gel di fosfato di calcio non è lo stesso nel quale esse emergerebbero da una colonna di un semplice scambiatore di anioni

o di cationi; questo è dovuto alla presenza contemporanea in questo adsorbente di cariche sia positive che negative ed alla particolare affinità di alcune proteine per il calcio.

Queste differenze però, lungi dal rappresentare uno svantaggio, aumentano anzi la validità della cromatografia su gel di fosfato di calcio quando questa venga usata in connessione con colonne di altri adsorbenti o con l'elettroforesi.

Tra le resine a scambio ionico, sono state usate nella cromatografia delle proteine con un certo successo la Dowex 1 e la Dowex 50 che sono resine polistireniche: la Dowex 1 è uno scambiatore di anioni di natura fortemente acida, la Dowex 50 uno scambiatore di cationi di natura fortemente basica. La capacità di queste resine di adsorbire le proteine è piuttosto piccola poichè, data la loro struttura porosa, le sostanze macromolecolari possono essere adsorbite solo dalle cariche presenti alla loro superficie esterna dato che le grosse molecole proteiche non possono penetrare nell'interno dei pori. Anzi, proprio ad evitare una parziale penetrazione di queste nei pori con conseguenze che potrebbero alterare e complicare la risoluzione cromatografica, vengono usati i tipi a struttura più stretta, come le Dowex 1 (o le Dowex 50) $\times$ 4 o $\times$ 8 che hanno una maggiore percentuale di divinilbenzene e quindi un più alto numero di legami trasversali. Inoltre molte proteine vengono adsorbite su queste resine in maniera tanto forte da non permettere una eluizione in condizioni compatibili con la stabilità delle proteine.

La resina a scambio ionico più largamente usata nella cromatografia delle proteine è però l'Amberlite IRC 50 che viene ora usata nella sua forma più finemente suddivisa denominata Amberlite X E 64. Si tratta di una resina carbossilica che è stata usata con successo come scambiatore di cationi nella cromatografia di proteine relativamente basiche, a valori di pH che permettono allo scambiatore di essere fortemente ionizzato ed alla proteina di mantenere ancora una carica positiva predominante. Questa resina ha una densità molto elevata di gruppi carbossilici (dell'ordine di circa 10 milliequivalenti per grammo) che compensando almeno in parte la proprietà generale delle resine a scambio ionico di non essere penetrate dalle macromolecole, aumenta notevolmente la sua capacità di adsorbire le proteine. Quando le proprietà delle proteine da separare lo permettano, la cromatografia su queste resine è molto efficace: purtroppo, come è ovvio, non è applicabile in tutti i casi. In molti casi con queste resine viene usato come eluente un tampone contenente urea: la possibilità di usare questo eluente è applicabile naturalmente solo alle proteine stabili, come ad esempio l'insulina e la ribonucleasi, e soprattutto alla separazione delle sub-unità di proteine che vengono dissociate dall'urea, particolarmente quando queste sub-unità sono insolubili nelle soluzioni prive d'urea.

Sober e Peterson ([4,5]) hanno preparato degli scambiatori di ioni attaccando alla cellulosa un certo numero, piuttosto limitato, di gruppi ioniz-

zabili. L'introduzione di queste fasi stazionarie è stata di enorme valore inquantochè esse sono praticamente utilizzabili per qualsisi tipo di proteina. Infatti la cellulosa conserva la sua originale microstruttura e quindi questi scambiatori di ioni si differenziano nettamente dalle resine che hanno struttura amorfa ed in parte idrofobica. La struttura estremamente aperta delle cellulose permette un esteso contatto con le grosse molecole e quindi una alta capacità di adsorbimento per le proteine; un ulteriore vantaggio è rappresentato dal fatto che la stabilità dei legami covalenti mediante i quali sono legati alla cellulosa i gruppi ionizzabili permette l'uso di una varietà praticamente illimitata di tamponi per di più con una grande varietà di pH.

La dietil-amminoetil-cellulosa (DEAE) è un debole scambiatore di anioni che contiene circa 1 milliequivalente di azoto basico per grammo di peso secco. Essa è stata largamente usata per la cromatografia di proteine acide o leggermente basiche: persino le labilissime 7-S-Gamma globuline possono essere adsorbite su questo supporto ad una bassa concentrazione salina ed a un pH piuttosto alto. Le sostanze anioniche forti che vengono legate troppo saldamente dalla DEAE possono essere utilmente cromatografate invece sulla ECTEOLA (epicloridrintrietanolammino-cellulosa), uno scambiatore di ioni che contiene più piccole quantità di gruppi basici più deboli e che viene più spesso usato per la separazione delle nucleo-proteine, degli acidi nucleici e dei nucleotidi.

La carbossimetilcellulosa (CM-cellulosa) è un debole scambiatore di cationi che ha avuto larga applicazione nella cromatografia delle proteine neutre o basiche. Essa ha una costante di dissociazione apparente, a seconda della concentrazione salina, compresa fra 3,5 e 4,2, e può essere usata anche per l'adsorbimento di proteine a basso punto isoelettrico.

È tuttavia da sottolineare che il punto isoelettrico non è l'unica proprietà a determinare l'adsorbimento, e quindi molto spesso non è possibile prevedere il comportamento di una proteina sulla sola base di questo parametro.

La cellulosa fosforilata (P-cellulosa) e la solfoetilcellulosa, (SE-cellulosa) sono scambiatori di cationi con gruppi acidi più forti, che mantengono quindi una carica negativa anche a pH molto bassi e possono essere usate quando è necessario cromatografare a pH basso o per l'instabilità delle proteine, come nel caso della pepsina, o per il pericolo di formazione di complessi o aggregati a pH più alti. La guanidiletilcellulosa (GE-cellulosa) e la trietil-amminoetilcellulosa (TEAE) sono invece forti scambiatori di anioni che permettono la cromatografia con valori alti del pH.

Questi forti scambiatori di ioni non vengono in effetti molto usati dato che la maggior parte delle proteine vengono alterate a pH molto alti o molto bassi, ma in particolari casi possono fornire buoni risultati anche nell'intervallo di pH (da 5 a 9) nel quale si opera generalmente.

Un'osservazione che è stata fatta molto frequentemente è che la DEAE-cellulosa può presentare delle grandi variazioni di capacità adsorbente da

una partita all'altra anche quando il contenuto di azoto rimane invariato. Secondo Peterson e Sober ([3,5]) si può ovviare a questo inconveniente saggiando partita per partita la cellulosa mediante l'uso di una miscela standard di proteine, come quella ad esempio fornita, con caratteri di grande uniformità, dal siero umano, e compensando le deficienze riscontrate con opportune variazioni della soluzione di eluizione. Secondo questi autori è però ancora consigliabile preparare la DEAE-cellulosa in laboratorio per avere l'assoluta garanzia della sua uniformità.

I destrani scambiatori di ioni infine sono stati preparati analogamente alle cellulose mediante l'introduzione nella molecola dei destrani di gruppi ionizzabili. Sono stati così preparati il DEAE-Sephadex, il CM-Sephadex e l'SE-Sephadex: le proprietà di filtro molecolare del Sephadex vengono così largamente modificate ma questi supporti conservano ugualmente un certo grado di proprietà filtrante; così il DEAE-Sephadex G-25, ad esempio, non viene penetrato da proteine di una certa grandezza molecolare, con il risultato che queste vengono debolmente adsorbite nonostante il contenuto piuttosto elevato di DEAE. Il DEAE-Sephadex 50 invece viene penetrato da molte proteine che vengono così più fortemente trattenute: la sua capacità di adsorbimento è approssimativamente quella della DEAE-cellulosa e, almeno secondo la nostra esperienza, la risoluzione che se ne ottiene è molto simile a quella ottenuta con quest'ultimo materiale. Per di più il Sephadex è soggetto a notevoli cambiamenti di volume in conseguenza dei cambiamenti di concentrazione salina e di pH che sono necessari per l'eluizione, e la cromatografia in queste condizioni presenta qualche difficoltà tecnica. Ci sembra quindi di poter concludere che, sebbene questo scambiatore di ioni abbia suscitato al suo apparire largo entusiasmo, le sue proprietà lo rendono più adatto probabilmente per sostanze le cui molecole siano di dimensioni alquanto minori di quelle di una tipica proteina.

Come è stato già detto, l'uso di un tampone di composizione costante per l'eluizione di una miscela proteica è utile solo in casi molto particolari. Quando ci si trova di fronte ad una miscela contenente solo pochi componenti con differenze piuttosto ampie nella loro affinità per l'adsorbente, questi possono essere eluiti separatamente mediante successivi cambiamenti del tampone. Quando l'affinità per l'adsorbente di due o più componenti è molto vicina, al contrario di quanto avviene con sostanze aventi molecole più piccole come gli amminoacidi o i peptidi, se si adopera un gradiente di composizione costante le proteine si muovono come bande molto larghe che lasciano lunghissime code. È quindi necessario adoperare un gradiente che abbia un potere di eluizione crescente: in questo caso le molecole di una determinata specie che sono più fermamente adsorbite alla fase stazionaria, e che sono poi quelle che formano le code, sono rimosse dalle frazioni immediatamente successive, ed a maggiore attività eluente del solvente, e la larghezza

delle zone viene notevolmente ridotta. Comunque, anche con gradienti di questo tipo, i picchi delle proteine sono in genere più larghi di quelli che si ottengono con sostanze aventi molecole più piccole. L'eluizione con un gradiente offre ancora altri vantaggi: infatti poichè le condizioni di pH o di concentrazione salina nelle quali una data proteina può entrare in equilibrio di adsorbimento con una data fase stazionaria sono molto ristrette, la scelta del tampone più conveniente per la sua eluizione diviene molto difficile; se poi è necessario separare più proteine, probabilmente sarà necessario scegliere più di un eluente, poichè le più favorevoli condizioni di eluizione delle differenti proteine presenti in un liquido biologico o in un estratto variano in maniera assai ampia. L'uso di un gradiente può automaticamente e successivamente soddisfare a tutte queste condizioni e la sua forma può facilmente essere modificata, come vedremo, per adattarsi alle particolari esigenze della miscela proteica che s'intende studiare, esigenze che possono agevolmente essere dedotte in via sperimentale. Inoltre gli artefatti che possono alterare i cromatogrammi ottenuti mediante successivi cambiamenti della soluzione eluente vengono molto ridotti con la eluizione mediante un gradiente.

Molti dei cromatogrammi di proteine che sono apparsi in letteratura sono stati ottenuti usando per l'eluizione successivi cambiamenti più o meno netti della soluzione eluente. Indubbiamente questo tipo di procedimento, con un gradiente a gradini, è stato scelto il più delle volte per la sua estrema semplicità e perchè con esso si ottengono picchi molto netti, sebbene non sia da escludere che in questa scelta abbia giocato la scarsa conoscenza dei pericoli che esso comporta. Le frazioni ottenute con successivi cambiamenti della soluzione eluente molto spesso contengono quantità non trascurabili di materiale appartenente ad uno o a tutti e due i picchi adiacenti; così una sola sostanza può comparire in tre picchi, e si può quasi affermare che una miscela proteica può essere risolta in un qualsivoglia numero di frazioni purchè vengano successivamente introdotte nel sistema, in numero sufficiente, differenti soluzioni eluenti. L'eluizione a gradini non può essere usata quindi per dimostrare l'eterogeneità di una proteina, tuttavia può essere usata vantaggiosamente, come già si è detto, nella separazione di componenti che abbiano affinità molto differenti per l'adsorbente; inoltre può essere utile per un arricchimento preliminare perchè i picchi che si ottengono con essa sono in genere molto più concentrati di quelli ottenuti con un gradiente continuo di eluizione.

Basandosi su una serie di considerazioni teoriche, Semenza suggerisce tre regole fondamentali, molto semplici, che debbono essere tenute presenti nella scelta delle condizioni di eluizione più adatte per ciascun tipo di sistema cromatografico:

1) Usare tamponi cationici (ad es. tris-HCl, piperazina-HCl) con gli scambiatori di anioni e tamponi anionici (fosfato, acetato) con scambiatori di cationi.

2) Con gli scambiatori di cationi adoperare gradienti di pH decrescenti, con gli scambiatori di anioni adoperare gradienti di pH crescenti.

3) Non operare mai con pH che sono vicini al pK dell'adsorbente.

La realizzazione di gradienti della concentrazione salina o del pH della soluzione eluente è stata largamente studiata sia dal punto di vista teorico che pratico. Occorre subito sottolineare che mentre, da un punto di vista teorico, la realizzazione di un gradiente di molarità di un tampone è relativamente facile poichè in questo caso entrano in giuoco solo le concentrazioni saline dei tamponi usati, lo studio di un gradiente del pH è complicato dal fatto che le variazioni del pH di una miscela di tamponi, anche se tutti della stessa molarità, non sono determinate soltanto dalle percentuali di questa miscela, ma anche da numerosi altri fattori come il potere tamponante di essi, la ionizzazione dei sali che varia a seconda del pH, ecc. In pratica, quindi, le condizioni che permettono la realizzazione di un gradiente di molarità di una certa forma non sono applicabili per ottenere un gradiente di pH della stessa forma; tuttavia, in genere, la forma del gradiente di pH non si discosta notevolmente da quella del gradiente di molarità realizzato con la stessa tecnica ed è quindi possibile avvalersi delle stesse apparecchiature per produrre gradienti di molarità e gradienti di pH, ma in questo ultimo caso è consigliabile verificare sperimentalmente la forma del gradiente che si ottiene.

Sono stati descritti un gran numero di dispositivi per la realizzazione dei gradienti di eluizione. Fra questi i più semplici possono essere schematicamente riportati a quelli raffigurati nella Fig. 3. A parte la tecnica per la

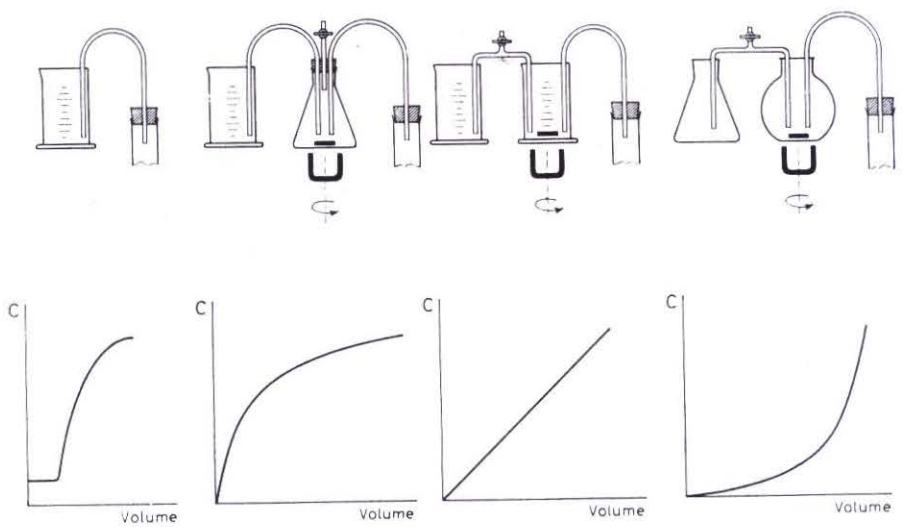

Fig. 3. — Alcune tecniche per la produzione di un gradiente continuo del pH o della concentrazione di un tampone. *In alto :* disposizione dei contenitori; *in basso :* il gradiente di tampone che ne risulta.

produzione di un gradiente discontinuo, che consiste, ovviamente, nel cambiare semplicemente il tampone (ad esempio, nell'imbuto separatore da cui questo scola nella colonna), è possibile realizzare i tre principali tipi di gradiente continuo con due recipienti comunicanti fra loro dei quali uno, di riserva, contiene il tampone così detto limitante o finale e l'altro, di rimescolamento, contiene da principio il tampone iniziale e via via la miscela dei due tamponi che viene rimescolata mediante un agitatore magnetico. Si ottiene un gradiente convesso quando il recipiente di rimescolamento è chiuso, rettilineo quando il recipiente di rimescolamento è aperto, concavo quando il recipiente di rimescolamento, aperto, è di forma differente dal recipiente di riserva. Naturalmente sono stati descritti, e sono usati, sistemi più complicati, fra i quali un dispositivo a nove camere (Fig. 4) di tipo autograd che è stato

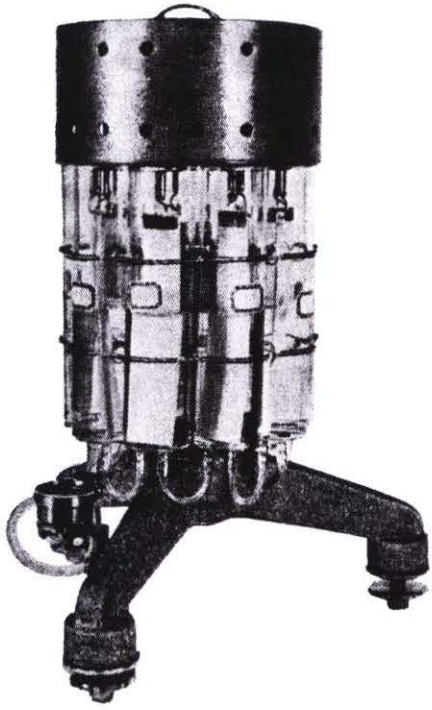

Fig. 4. — Erogatore di soluzioni a concentrazione variabile per cromatografia; tipo a 9 camere. Riprodotta da (6).

costruito in Istituto con la collaborazione dell'Ing. Scaccia-Scarafoni (6). Esso è costituito da nove recipienti cilindrici aperti, contenenti un agitatore in teflon e comunicanti ciascuno con il precedente ed il successivo mediante tubicini di entrata e di uscita collegati fra loro con tubi di teflon. Con questo dispositivo è possibile variare a seconda delle necessità sperimentali la forma

del gradiente: a questo scopo è stata calcolata e riportata in grafico (Fig. 5) la contribuzione delle nove camere nella formazione di ciascuna frazione del gradiente (7). In questo grafico sull'ascissa è riportata la percentuale del volume totale dei solventi contenuti nelle nove camere, sull'ordinata sono riportate le percentuali di contribuzione: le curve disegnate rappresentano

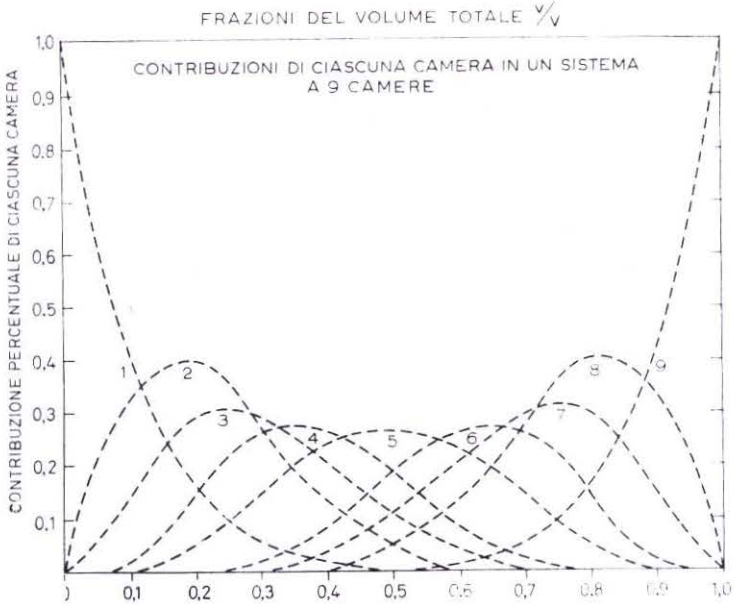

Fig. 5. — Contribuzione delle nove camere dell'erogatore di soluzioni nella formazione di ciascuna frazione del gradiente di tampone. Riprodotta da (7).

quindi la contribuzione di ciascuna delle nove camere nella formazione di ciascuna frazione del gradiente.

Ad esempio, se due proteine differenti emergono non ben separate dopo che attraverso la colonna è percolato il 60 % della soluzione eluente, sarà possibile modificare questa sola porzione del gradiente, lasciandone pressochè inalterato il resto, deducendo dal grafico che le camere 5, 6 e 7 contribuiscono in quel punto per il 23 %, per il 26 % e per il 22 % alla formazione della soluzione e modificando opportunamente la composizione della soluzione contenuta in queste camere allo scopo di ottenere una migliore separazione delle due proteine.

Vorrei ora dimostrare qualche esempio di separazione di proteine eterogenee per mezzo di cromatografia su colonna, realizzate nel corso del lavoro eseguito dal nostro gruppo di studio.

La Fig. 6 riguarda la separazione della emoglobina di rospo dalle proteine non emoglobiniche contenute negli emolisati delle emazie di questo animale. In questo caso sono state usate colonne di CM-cellulosa di 1 × 50 cm equilibrate a pH 6,8. Le proteine non emoglobiniche vengono eluite, come appare nel grafico, dal tampone iniziale; successivamente, mediante l'autograd a nove camere, è stato realizzato un gradiente continuo del pH del tampone da pH 6,8 a pH 8 per eluire l'emoglobina ed eventualmente sepa-

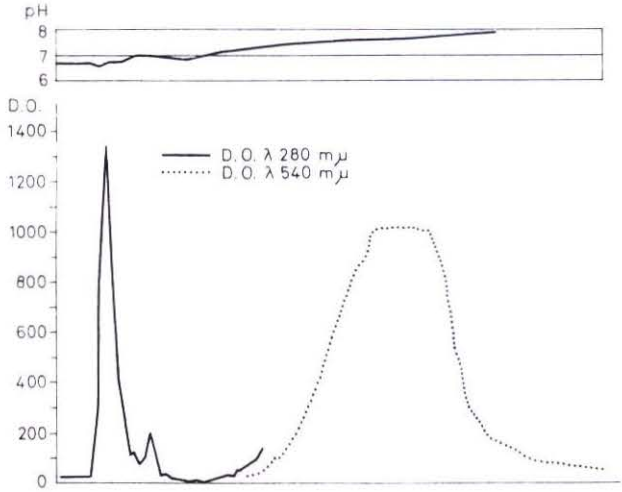

Fig. 6. — Separazione della emoglobina dalle altre proteine contenute negli emolisati delle emazie di rospo. Colonne di CM-cellulosa di 1 × 50 cm. *In alto :* curva del gradiente di pH; *in basso :* curva di eluizione.

rarla nei suoi diversi componenti. Dal punto di vista cromatografico l'emoglobina sembra omogenea, ma con l'elettroforesi su gel di amido è possibile separare due componenti. Sono stati sperimentati diversi gradienti e diversi supporti allo scopo di riuscire ad ottenere anche una separazione cromatografica di questi, ma sempre senza successo. Questa esperienza è stata appunto riferita per sottolineare il fatto che non sempre è possibile mettere in evidenza con metodi cromatografici l'eterogeneità di una proteina.

La Fig. 7 rappresenta la purificazione di un enzima proteolitico di origine vegetale realizzata nel corso di una ricerca eseguita in collaborazione con i prof.ri Marini-Bettolo e Angeletti ([8]). Una prima purificazione è stata ottenuta in questo caso con colonne di DEAE-cellulosa impiegando un tampone tris-fosfato: in queste condizioni una parte delle proteine contenute nella polvere grezza di ficina viene fissata alla colonna, mentre tutta la frazione che si eluisce col tampone iniziale contiene praticamente tutta l'atti-

vità proteolitica; la successiva applicazione di un gradiente di molarità del tampone eluisce altre proteine prive di attività. Una seconda cromatografia

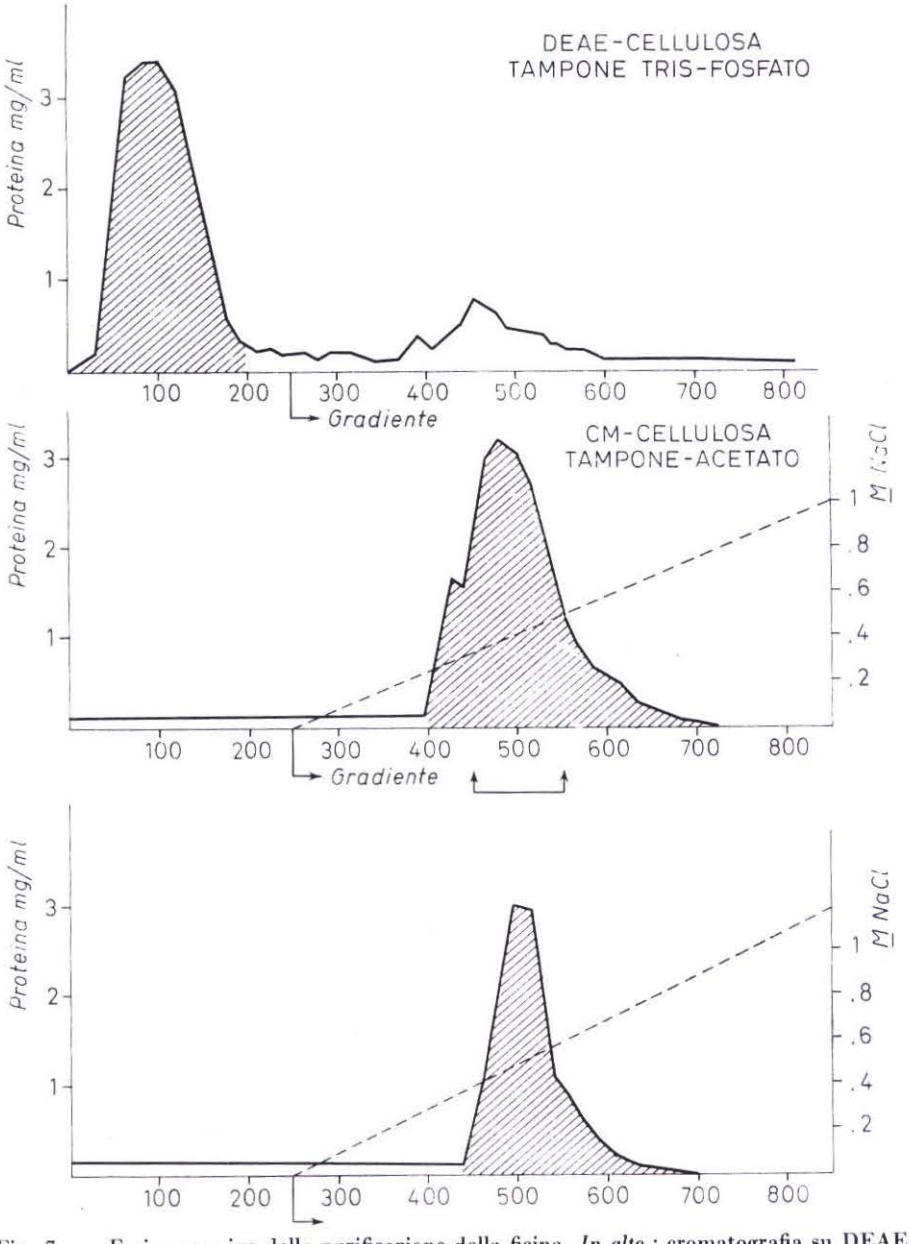

Fig. 7. — Fasi successive della purificazione della ficina. *In alto :* cromatografia su DEAE-cellulosa; *in mezzo :* purificazione successiva su colonne di CM-cellulosa; *in basso :* ricromatografia della ficina purificata nelle stesse condizioni dell'esperimento precedente. Riprodotta da ([8]).

su colonna di CM-cellulosa eseguita con un gradiente di concentrazione rispetto al sodio del tampone acetato consente la completa purificazione dell'enzima, che è dimostrata dall'identico comportamento di esso alla successiva ricromatografia nelle stesse condizioni.

La Fig. 8 rappresenta la separazione cromatografica dei tre componenti della cianometaemoglobina di *Rana esculenta* L. (9) realizzata su colonne

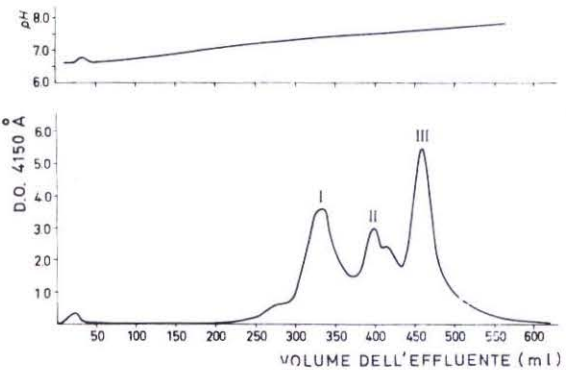

Fig. 8. — Separazione cromatografica su colonne di CM-cellulosa di 1 × 50 cm dei componenti della cianometaemoglobina di *Rana esculenta* L. Gradiente di tampone fosfati 0,01 M, da pH 6,6 a pH 8,0. *In alto :* curva del gradiente di pH ; *in basso :* curva di eluizione. Riprodotta da (9).

di CM-cellulosa 50 × 1 cm con un gradiente di tampone fosfato 0,01 M da pH 6,6 a pH 8; questo gradiente disegnato in alto nella figura, è stato ottenuto con l'impiego dell'autograd che è stato precedentemente descritto. La determinazione della D. O. dell'effluente è stata eseguita a 415 mμ cioè nella cosidetta « banda di Soret » caratteristica della emoglobina.

Anche in questo caso, poichè l'esperimento è stato eseguito con emolisato totale da emazie di *Rana esculenta* L. le proteine non emoglobiniche emergono con il fronte della colonna; il picco appare molto esiguo poichè la lettura, come si è detto, è stata eseguita a 415 mμ, e questi componenti non presentano la «banda di Soret»; d'altra parte la lettura nell'ultravioletto, a 280 mμ, che avrebbe potuto dare un'idea della reale quantità di queste proteine presente nell'emolisato, non è stata riportata nella figura per motivi di chiarezza.

La Fig. 9 rappresenta la ricromatografia dei tre componenti, separati come è stato detto, eseguita nelle stesse condizioni sperimentali. Ciascuno dei tre componenti si comporta come una singola specie molecolare : il volume di effluente, e quindi il pH di emergenza dei tre componenti, è infatti identico nelle due esperienze. L'omogeneità dei componenti è stata comunque con-

trollata anche con l'elettroforesi su gel di amido e con l'analisi quantitativa degli amminoacidi.

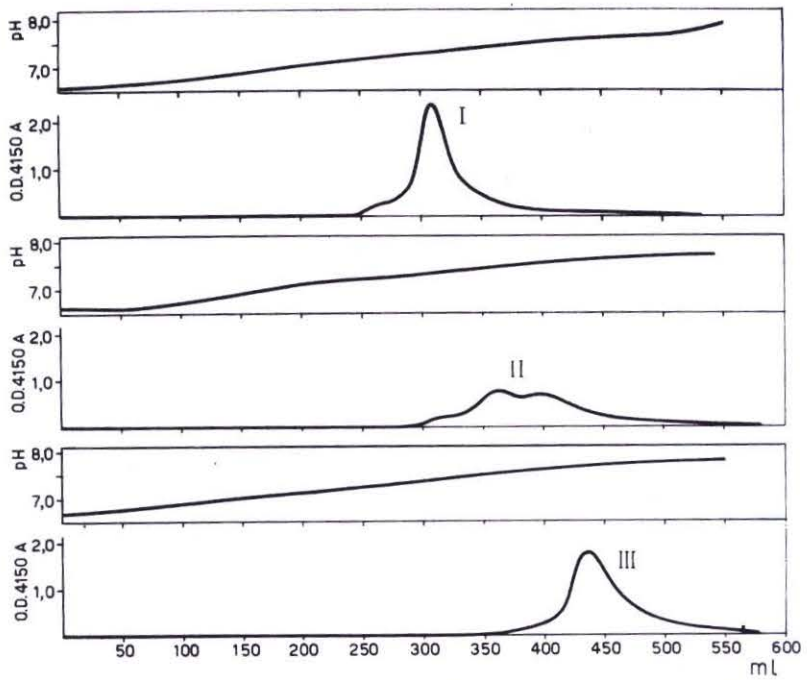

Fig. 9. — Ricromatografia dei tre componenti della cianometemoglobina di *Rana esculenta* L. in condizioni sperimentali identiche a quelle della figura precedente. Riprodotta da (9).

Nella Fig. 10 è riportata la separazione della emoglobina di *Rana esculenta* in forma ossi, realizzata sempre su colonne di 1 × 50 cm di CM-cellu-

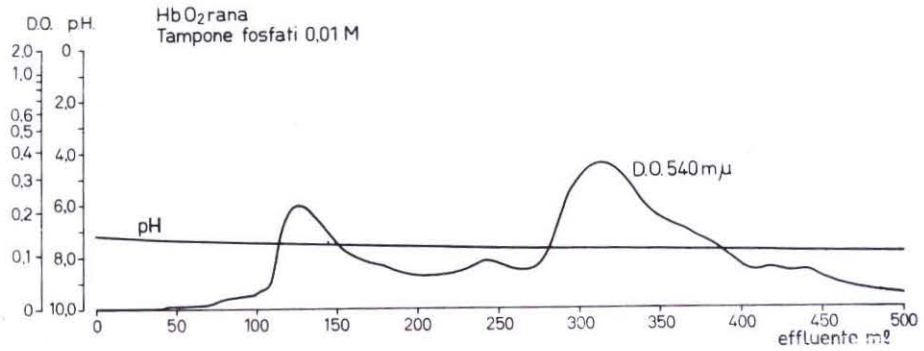

Fig. 10. — Separazione cromatografica su colonna di 1 × 50 cm di CM-cellulosa dei due componenti della ossiemoglobina di *Rana esculenta* L. Gradiente di tampone fosfati 0,01 M da pH 6,8 a pH 8,0 + EDTA 10^{-4} M.

losa con un gradiente di tampone fosfati 0,01 M da pH 6,8 a pH 8. Poichè questa forma di emoglobina è particolarmente labile, al tampone è stato aggiunto EDTA in concentrazione 10^{-4} molare come chelante per evitare, come è stato detto prima, l'ossidazione dei ponti disolfuro; i risultati sono stati eccellenti ed un controllo dello spettro dei componenti isolati ha permesso di dimostrare che durante l'esperimento non si è avuta alcuna formazione di metaemoglobina, che invece si forma in quantità piuttosto considerevoli con l'uso del tampone privo di EDTA. Come si vede la ossiemoglobina, si separa in due componenti mentre la cianometaemoglobina, in condizioni sperimentali molto simili, si separa in tre componenti; tuttavia il secondo componente della ossiemoglobina che, come tale, è omogeneo anche in elettroforesi su gel di amido, si sdoppia in due componenti, sempre in elettroforesi su gel di amido, quando viene trasformato in cianometaemoglobina: evidentemente la trasformazione in cianometaemoglobina modifica le proprietà molecolari della ossiemoglobina in modo da alterare la sua affinità per il substrato, CM-cellulosa; le ragioni di questo comportamento sono attualmente studiate dal nostro gruppo.

La Fig. 11 rappresenta l'eluizione ancora della ossiemoglobina di rana realizzata sempre da una colonna di CM-cellulosa di 1 × 50 cm ma usando

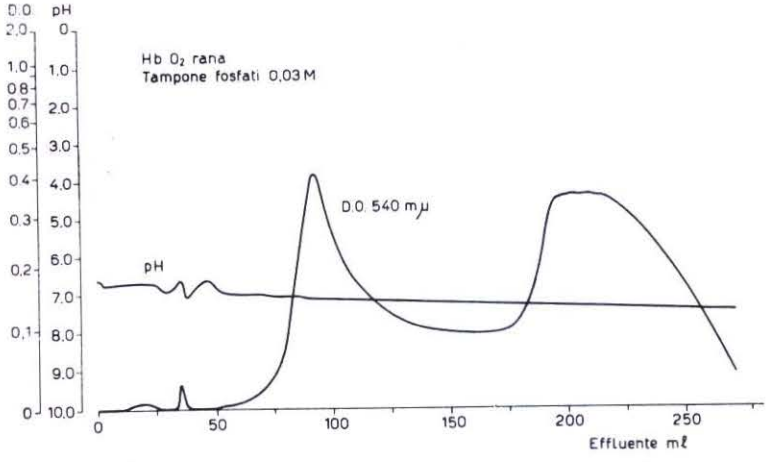

Fig. 11. — Separazione cromatografica su colonna di CM-cellulosa dei due componenti della ossiemoglobina di *Rana esculenta* L. L'esperienza è stata eseguita nelle stesse condizioni di quella della figura precedente ma con tampone a forza ionica tre volte superiore.

tampone fosfato 0,03 M anzichè 0,01 M; in questo caso l'eluizione è completa dopo 250 ml di effluente anzichè dopo 450 ml di effluente, in altre parole un aumento della concentrazione del tampone produce un distacco più rapido della proteina dal supporto.

La Fig. 12 rappresenta una esperienza dello stesso tipo della precedente che dimostra le vaste possibilità delle moderne apparecchiature automatiche. Si tratta della registrazione automatica della D. O. dell'effluente effettuata a due lunghezze d'onda: 415 mμ (curva 1) e 540 mμ (curve 2 e 3). Vengono registrate due curve per ciascuna lunghezza d'onda perchè lo

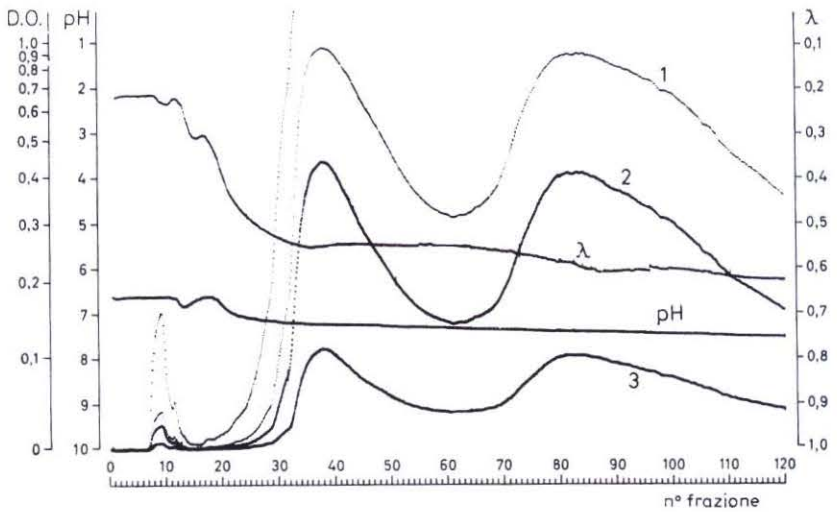

Fig. 12. — Separazione cromatografica su colonna di 2 × 50 cm di CM-cellulosa dei due componenti della ossiemoglobina di *Rana esculenta* L. Registrazione dell'esperimento eseguita con una apparecchiatura automatica. Gradiente di tampone fosfati 0,03 M da pH 6,8 a pH 8,0 + EDTA 10^{-4} M. Riprodotta da ([10]).

spettrofotometro legge con due cammini ottici differenti: di un centimetro (curva 2), e di 0,25 cm (curve 1 e 3). Le altre due curve rappresentano la registrazione della conducibilità elettrica (λ) e del pH dell'effluente. La conducibilità elettrica presenta all'inizio dell'esperimento un notevole aumento poichè la colonna di CM-cellulosa è stata equilibrata con tampone fosfato 0,01 M mentre l'esperimento viene eseguito con tampone 0,03 M. Infine i segni alla base della figura registrano l'avanzamento del collettore automatico di frazioni, in altre parole per ciascuna frazione dell'effluente rappresentata nel grafico è possibile stabilire esattamente la provetta nella quale è stata raccolta.

Un'altra particolarità dell'esperimento è rappresentata dal fatto che in questo caso è stata usata una colonna preparativa di 2 × 50 cm di CM-cellulosa: il volume della colonna è quindi quadruplo di quello di una colonna di 1 × 50 cm ed è quindi possibile applicare sulla colonna una quantità di proteina quattro volte maggiore. Ovviamente, per ottenere un grafico che

è quasi sovrapponibile a quello della figura precedente è stato necessario aumentare di quattro volte la velocità del flusso del tampone attraverso la colonna.

La Fig. 13 rappresenta la separazione delle due subunità della emoglobina umana normale. Questa separazione è stata ottenuta impiegando colonne

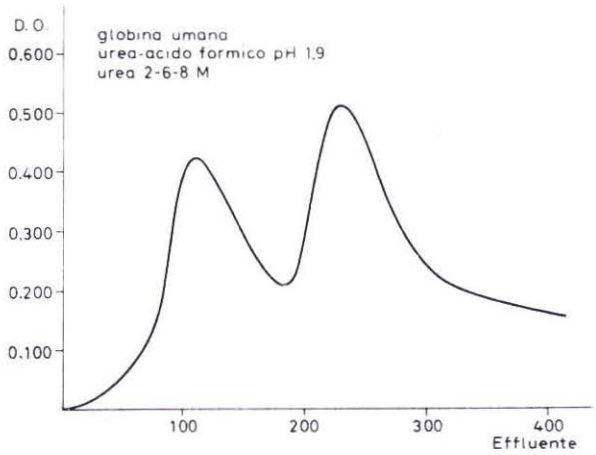

Fig. 13. — Separazione cromatografica su colonne di Amberlite IRC 50 di 1 × 50 cm delle due sub-unità della emoglobina umana. Eluizione con tampone formiato pH 1,9 e gradiente di molarità di urea da 2,0 a 8,0 M.

di Amberlite IRC 50 di 1 × 50 cm equilibrate con tampone formiato pH 1,9; l'eluizione è stata effettuata con un gradiente di concentrazione dell'urea in tampone formiato sempre pH 1,9; all'inizio dell'esperimento nella camera

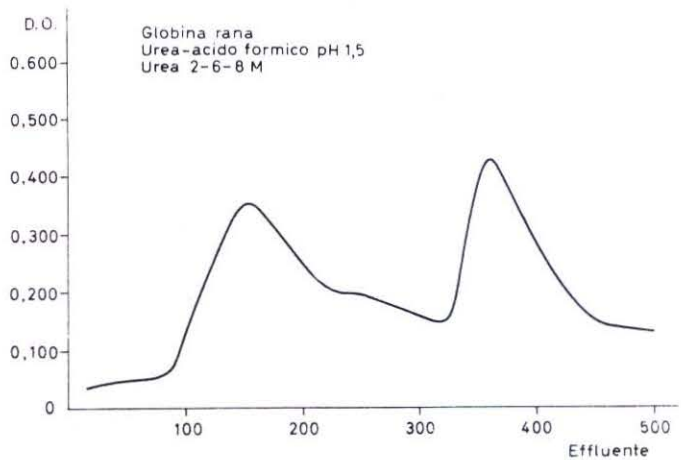

Fig. 14. — Separazione cromatografica su colonne di Amberlite IRC 50 delle due sub-unità della emoglobina di *Rana esculenta* L. Condizioni sperimentali identiche a quelle della figura precedente.

di mescolamento è contenuta una soluzione di urea 2,0 M e nella camera di riserva una soluzione di urea 6,0 M; dopo l'eluizione del primo picco, costituito dalla catena alfa, questa seconda soluzione veniva sostituita con un'altra contenente una concentrazione 8,0 M di urea.

Una analoga separazione delle sub-unità della emoglobina di *Rana esculenta*, ottenuta nelle identiche condizioni sperimentali, è rappresentata nella Fig. 14.

Infine la Fig. 15 rappresenta un esperimento di separazione a riciclo su una colonna di Sephadex G-100 di 2 × 50 cm di una miscela di ovo-

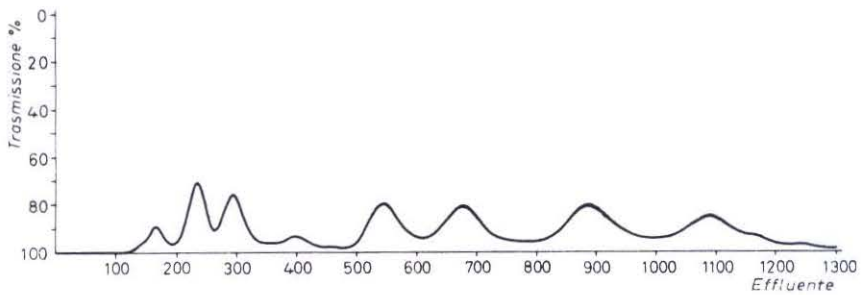

Fig. 15. — Separazione cromatografica di ovoalbumina dalla frazione V di albumina bovina eseguita a riciclo su colonna di Sephadex G-100 di 2 × 50 cm con tampone fosfato pH 8,0 contenente NaCl 0,2 M.

albumina (P. M. 46000) e di frazione V di albumina bovina (P. M. 68000) ottenuta con un tampone contenente NaCl 0,2 M e fosfato 0,1 M a pH 8,0. L'artificio consiste nel convogliare di nuovo sulla colonna l'effluente: una prima separazione (i primi tre picchi) dimostra la presenza di impurità (primo picco): prima del secondo passaggio sulla colonna l'effluente corrispondente alla impurità (da 370 a 430 ml) è stato scartato e, come si vede, nei successivi ricicli si ottengono solo due picchi, sempre meglio separati anche se con code più lunghe.

BIBLIOGRAFIA

(1) N. K. Boardman & S. M. Partridge. Separation of neutral proteins on ion exchange resins. *Biochem. J.*, **59**, 543-552 (1955).

(2) A. B. Edmundson & C. H. W. Hirs. On the structure of sperm whale mioglobin. I. The aminoacid composition and terminal groups of the chromatographically purified protein. *J. Mol. Biol.*, **5**, 663-682 (1962).

(3) H. A. Sober, R. W. Hartley, W. R. Carrol & E. A. Peterson. Fractionation of proteins. In: *The proteins*, H. Neurath. Ed., Academic Press Inc., 1965, p. 2-98.

(4) H. A. Sober & E. A. Peterson. Chromatography of proteins on cellulose ion exchangers. *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 1711-1712 (1954).

(5) H. A. Sober & A. E. Peterson. Chromatography of proteins. I-Cellulose ion-exchange adsorbents. *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 751-755 (1956).

(6) G. Scaccia Scarafoni, L. Tentori & G. Vivaldi. Erogatore di soluzioni a concentrazione variabile per cromatografia. *Rend. Ist. Super. Sanità*, **25**, 1072-1078 (1962).

(7) Technicon Instruments Co. Inc. *DNP Analyzer Manual* (1963).

(8) G. B. Marini Bettolo, P. U. Angeletti, M. L. Salvi, L. Tentori & G. Vivaldi. Ricerche sulla ficina. Nota 1 – Purificazione, caratterizzazione e composizione in aminoacidi. *Gazz. Chim. Ital.*, **93**, 1239-1251 (1963).

(9) L. Tentori, G. Vivaldi, S. Carta, A. M. Salvati, M. Sorcini & S. Velani. The hemoglobin of amphibia. Characterization of the hemoglobin of *Rana esculenta* L. Physicochemical properties and aminoacid composition. *Arch. Biochem. Biophys.*, **108**, 404-414 (1965).

(10) L. Tentori, G. Vivaldi, S. Carta & A. M. Salvati. L'emoglobina di anfibi – IV. Comportamento cromatografico ed elettroforetico della ossiemoglobina di *Rana esculenta* L. *Ann. Ist. Super. Sanità*, **2**, 47 (1966)..