

JERZY MAZURCZAK

OZNACZANIE WOLNYCH AMINOKWASÓW W PŁYNIE MÓZGOWO-RDZENIOWYM U PSÓW METODĄ JONOFOREZY I CHROMATOGRAFII

Klinika Chorób Wewnętrznych Zwierząt SGGW
Kierownik: Doc. dr FELIKS NAGÓRSKI

Szybki rozwój metod chromatograficznych, zwłaszcza chromatografii bibułowej i jej zastosowanie w biochemii, pozwala na bardziej wnikliwe analizowanie szeregu związków organicznych i nieorganicznych odgrywających rolę w procesach biologicznych toczących się w organizmie żywym. Obecnie istnieje już bogata literatura poświęcona metodom chromatograficznym oraz wynikom otrzymywanym przy pomocy tej metody, omawiającym rolę i przemiany całego szeregu związków w organizmie żywym. Szczególnie bogata jest literatura poświęcona analizie aminokwasów (monografie — Hais i Macek, Block, Cramer, Turba), to jednakże prac poświęconych analizie składu aminokwasów występujących w płynie mózgowo-rdzeniowym (Pm-r) jest stosunkowo niewiele. Prace poświęcone temu zagadnieniu omawiają głównie skład wolnych aminokwasów Pm-r, człowieka, autorzy analizują występowanie wolnych aminokwasów u osobników zdrowych (Kemali, Porzellati, Torre, Scarzella, Prior, Logothetis) oraz zachowanie się wolnych aminokwasów w szeregu schorzeń układu nerwowego (Rossi, Wolker, Telles, Torre i inni).

Prac omawiających to zagadnienie u zwierząt w dostępnej literaturze nie spotkałem. Celem niniejszej pracy jest podjęcie prób oznaczania wolnych aminokwasów w P m-r, u psów zdrowych.

Metodyka

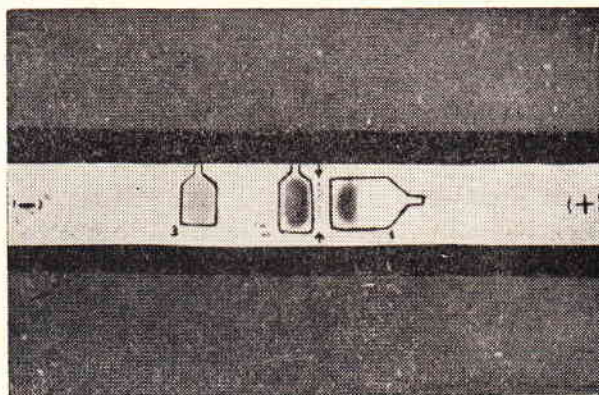
Płyn mózgowo-rdzeniowy pobierano od psów zdrowych, wolnych od zaburzeń ze strony układu nerwowego, drogą nakłucia podpotylicznego do przestrzeni podoponowych (wg Mõcsy). Do badania pobierano jednorazowo 5 ml płynu. Zabieg ten był dla psa zupełnie nieszkodliwy, i psy po nakłuciu zachowywały się normalnie. Do doświadczeń użyto 5 psów, w tym od dwóch psów płyn pobierano dwukrotnie.

Pobrane płyny odbiałczano alkoholem etylowym 95% (w stosunku 1—10). Odłuszczenie przeprowadzano chloroformem wg Hermann'a. Odsalanie wykonano mieszaniną acetonu z kwasem solnym *) wg Bisert'a. Przygotowane w ten sposób próbki rozpuszczano w 0,5 ml alkoholu izo-propylowego.

W pierwszej fazie badań przeprowadzano rozdzielanie aminokwasów na frakcje drogą jonoforezy. W tym celu na 4 paski bibuły Whatman Nr 1 o wymiarach 3×30 cm nanoszono w linii

*) wg Boulanger i Biserte'a — mieszanina 10 N HCl z $(\text{CH}_3)_2\text{CO}$ w stos. 1:100 v/v.

środkowej 45 mikrol. badanej substancji i umieszczano je w komorze wilgotnej. Do rozdzielania użyto buforu pirydynowo-octanowego (wg Michl'a). Czas przepływu prądu wynosił 2 godz. przy napięciu 6 V/cm. Po wysuszeniu pasków początkowo w temp. pokojowej a następnie w suszarce w temp. 50°, jeden pasek barwiono ninhydryną (0,2% roztw. ninhydryny w alkoholu etylowym). Po wysuszeniu w temp. 60° w ciągu 15 min. pojawiły się na pasku trzy frakcje aminokwasów wyraźnie od siebie oddzielone. Przedstawiały one sobą zgrupowania aminokwasów zasadowych obojętnych i kwaśnych z tym, że grupa aminokwasów kwaśnych pozwala wyróżnić poszczególne aminokwasy — wyraźnie odgraniczony kwas glutaminowy, niewielką plamę kwasu asparaginowego, i ślady cysteiny. Pozostałe grupy dawały jedną wyraźną plamę aminokwasów obojętnych i lekko rozlaną plamę aminokwasów zasadowych (Fot. 1).



Fot. 1. Jonogram wolnych aminokwasów P m-r psa.
1 — grupa aminokwasów kwaśnych; 2 — grupa aminokwasów obojętnych; 3 — grupa aminokwasów zasadowych; linia przerywana — miejsce naniesienia

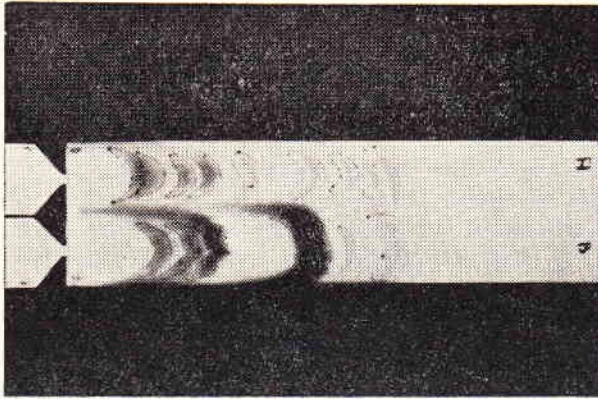
Porównując rozmieszczenie poszczególnych grup wycinano odpowiednie skrawki z pozostałych pasków niebarwionych, które poddawano chromatografii.

W drugiej fazie badań odpowiednio wycięte poszczególne frakcje dołączono do pasków bibuły o wymiarach 3×28 cm, i następnie zawieszano w cylindrach stosując metodę chromatografii wstępującej. Jako rozpuszczalnika użyto mieszaniny n-butanolu, kwasu octowego lodowatego i wody w stosunku 4:1:1. Czas wstępowania rozpuszczalnika wynosił 15 godz. Chromatogramy barwiono ninhydryną i wybranymi barwnikami selektywnymi. Identyfikację rozdzielanych na chromatogramie aminokwasów przeprowadzano przez porównywanie wartości Rf standardów poszczególnych aminokwasów poddawanych jednocześnie chromatografii (fot 2).

Omówienie wyników

Jonoforezę do rozdzielania aminokwasów stosowało szereg autorów. Jedni z nich, (Wieland, Fischer) przy zastosowaniu niskich

napięcie — do 5 V/cm otrzymywali grupowy rozdział aminokwasów. Michl, Westphal, Turoa stosując wysokie napięcia do 100 V/cm otrzymywali bardziej dokładny rozdział do po-



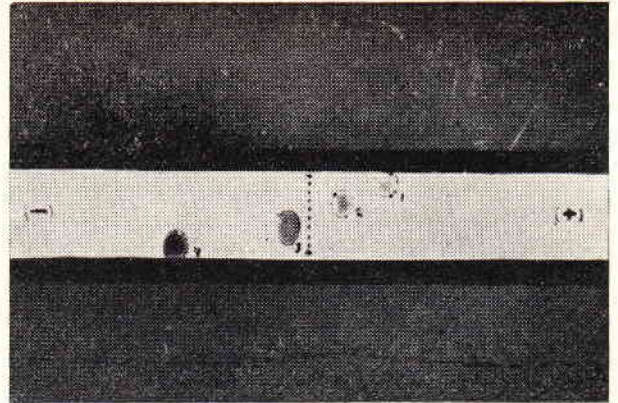
Fot. 2. Chromatogram grupy aminokwasów obojętnych. A — rozdział aminokwasów wycinka badanego; B — rozdział wybranych standartów, naniesionych na podobny wycinek czystej bibuły

jedynczych aminokwasów. Zastosowanie wysokich napięć wymaga bardziej skomplikowanej aparatury, wówczas, gdy metoda niskich napięć jest nieskomplikowana i łatwa w wykonaniu. W pracy niniejszej rozdział aminokwasów przeprowadzono przy pomocy niskich napięć.

Rozmieszczenie poszczególnych grup aminokwasów zależnie od właściwych im punktów izoelektrycznych jest zależne między innymi od pH użytego buforu i jego składu. Po przebadaniu szeregu buforów, zadowalające wyniki dawał bufor pirydynowo-octanowy o pH 3,9.

Celem sprawdzenia zachowania się poszczególnych aminokwasów w przebiegu jonoforezy, przebadano 18 standartów aminokwasów. W wyniku otrzymano, rozmieszczenie wszystkich badanych aminokwasów w trzech jednakowych kolumnach. (standarty naniesione były po cztery na jeden pasek, rozdział ich przebiegał w tych samych warunkach). W grupie aminokwasów zasadowych odkładały się — arginina, histydyna, lizyna w grupie obojętnych — alani- na, norwalina, norleucyna, fenyloalanina, walina, prolina, leucyna, tryptofan, cystyna, treonina, seryna, oraz glikokol. W grupie kwaśnych — kwas asparaginowy, kwas glutaminowy, cysteina. (Fot 3). Tego rodzaju podział aminokwasów pozwalał w ogólnych zarysach zorientować się o składzie poszczególnych aminokwasów w grupowym rozdziale aminokwasów P m-r. i częściowo ułatwiał ich identyfikację. Poddając analizie chromatograficznej poszczególne frakcje stwierdzono — wycinek grupy aminokwasów kwaśnych dał w efekcie plamy barwne odkładające się na wysokości Rf odpowiadającym standartom kwasu glutaminowego i kwasu asparaginowego. Zaznaczający się na jonogramie cień cysteiny umiejscowiony przed kwasem asparaginowym z uwagi na małą jego ilość nie

został stwierdzony na chromatogramie. Wycinek grupy aminokwasów obojętnych z jonogramu P m-r. poddany chromatografowaniu, wykazał po zidentyfikowaniu ze standartami obec-



Fot. 3. Jonogram czystych aminokwasów 1 — kwas asparaginowy; 2 — kwas glutaminowy; 3 — alanina; 4 — arginina

ność nast. aminokwasów — glicyny, seryny, treoniny, alaniny, waliny, fenyloalaniny, leucyny. Ponadto między alaniną i waliną odkładał się jeden aminokwas, którego ze względu na brak standartów nieidentyfikowano, a który w oparciu o dane z literatury i wartości jego Rf odpowiada kw. α -aminomasłowemu. Przy barwieniu chromatogramu izatyną stwierdzono obecność prolina.

Ponieważ w danym układzie rozpuszczalnika walina, metionina i tryptofan odkładają się na jednej wysokości, przeprowadzono barwienia selektywne na obecność tych dwu związków, które wypadły negatywnie.

Wycinek jonogramu zawierający grupę aminokwasów zasadowych wykazał na chromatogramie obecność argininy, histydyny i lizyny. Ogółem rozdzielono 15 aminokwasów w tym 2 niecałkowicie zidentyfikowane.

Dotychczasowe dane z literatury na temat wolnych aminokwasów w P m-r. u człowieka przedstawiają się dość różnie, mimo stosowania we wszystkich przypadkach metody chromatograficznej. Dane te ilustruje tabela wg Logothetis'a, do której dla porównania dołączono wyniki własne.

Cytowani wyżej autorzy stosowali w swoich badaniach metodę chromatografii dwukierunkowej, nie stosowali natomiast metod kombinowanych (łączenia jonoforezy z chromatografią, bądź chromatografii wielokierunkowej)

Badania nad składem wolnych aminokwasów w P m-r. u ludzi wykazują, że skład jakościowy aminokwasów u osobników zdrowych ulega stosunkowo minimalnym zmianom, miarodajne w tym wypadku są zwłaszcza badania Logothetis'a, który przebadał 17 osobników zdrowych i stwierdził, że większość zidentyfikowanych przez niego aminokwasów stale występowała w P m-r. Autor ten przebadał również 193 przy-

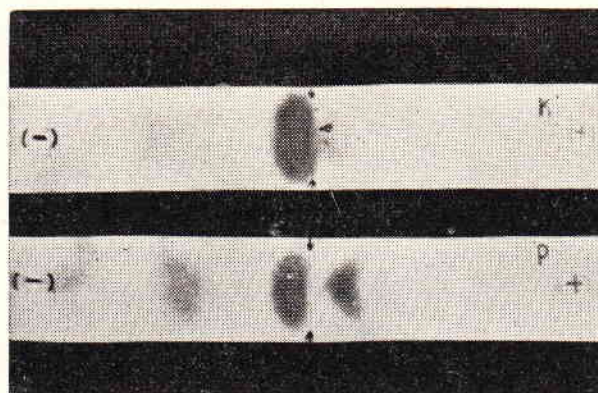
	Solomon i wsp. 1947	Boulan- ger i wsp. 1949	Pond 1950	Kemali i wsp. 1952/3	Schö- nenberg 1953	Torre i wsp. 1953	Reitman i wsp. 1954	Walker i wsp. 1954	Logo- thetis 1955	Badania własne
Ilość przypadków	16	pojed.	25	25	pojed.	10	30	?	210	5
Asparaginowy kw.		x		x				x	x	x
Alanina		x	x	x	x	x	x	x	x	x
Arginina	x			x		x		x	x	x
Asparagina									?	
Cystyna/cysteina	x			x		x			x	?
Glutaminowy kw.		x	x	x		x	xx	x	x	x
Glutamina			x	x			x	x	x	
Glicyna		x	x	x		x		x	x	x
α amino-masł. kw.									x	?
γ amino-masł. kw.							x	x	x	
Fenylalanina	x			x		x		x	x	x
Histydyna	x			x		x			x	x
Izyna	x				x			x	x	x
Leucyna	x	x	x	x	x	x		x	x	x
Metionina	x									
Ornityna								x		
Prolina								x	x	x
Seryna		x		?				x	x	x
Tryptofan						x	x			
Treonina	x							x	x	x
Tyrozyna	x			x		x		x	x	
Walina	x	x	x	x		x	x	x	x	x
razem ilość zidentyfi- kowanych aminokwasów	10	7	6	12+1?	3	11	6	16	18+1?	13+2?

padki chorobowe, w których stwierdził wyraźne różnice ilościowe przy minimalnych zmianach jakościowych. Przyjmuje on, że skład wolnych aminokwasów w przebadanych ogółem 210 przypadkach był stały w 85%. U przebadanych 5 psów odchylen jakościowych nie stwierdzono.

Wnioski

Otrzymane wyniki, jakkolwiek oparte na skromnym materiale doświadczalnym, wykazują, że w płynie mózgowo-rdzeniowym u psów zdrowych występuje przeciętnie około 15 wolnych aminokwasów. Badania przeprowadzone sprowadzały się głównie do oznaczeń jakościowych, strona ilościowa zagadnienia jako temat dalszych prac w tym wypadku została pominięta. Brak danych w dostępnej literaturze co do tego zagadnienia u psów nie pozwala na konfrontację otrzymanych wyników, można jednak przypuszczać, że skromny ten materiał może posłużyć jako materiał wstępny do dalszych badań nad zachowaniem się wolnych aminokwasów w płynie mózgowo-rdzeniowym u psów w stanach fizjologicznych i chorobowych. Zastosowanie jonoforezy jako fazy wstępnej przy analizie chromatograficznej aminokwasów pozwala na eliminowanie uciążliwych metod chro-

matograficznych (chromatografii dwukierunkowej) oraz pozwala przy użyciu metody paskowej na łatwiejszą identyfikację poszczególnych aminokwasów z uwagi na wstępny ich podział grupowy w czasie jonoforezy. Dodatnią stroną tego postępowania wydaje się również fakt, że występujące w różnym stosunku ilościowym wolne aminokwasy płynu mózgowo-rdzeniowego, przy dużym ich zagęszczeniu w próbkach



Fot. 4. Jonogram wolnych aminokwasów
K — surowicy krwi psa; P — płynu mózgowo-rdzeniowego psa

przygotowanych do analizy, przy bezpośrednim chromatografowaniu na skutek tworzenia rozległych plam przez te aminokwasy, których jest stosunkowo najwięcej, utrudniają odczytanie chromatogramu. Tego rodzaju trudności można usunąć stosując wstępnie jonoforezę. (fot 4).

Piśmiennictwo

1) Block R. J. A manual of paper chrom. and paper electrophoresis N. Y. 1955. 2) Mc Donald D. Sc.: Jono-graphy-Electrophoresis in stabilized Media Chicago 1955. 3) Esser H., Heinzler F.: Schweiz. Med. Wschr. 85, 8, 1955. 4) Grassmann W., Hannig K., Plöckl M.: Hoppe-Seyler Zeitschr. für physiol. Chem. 299, 5-6, 1955. 5) Grassmann W., Hannig K.: j. w. 293, 32, 1953. 6) Herman F., Bickel H., Fanconi G.: Helv. Pediatr. Acta 397, 414, 1949. 7) Hais J. M., Macek K.: Papiřová Chromatografie Praha 1954. 8) Kemali D., Porcellati G.: Bollet. Della Soc. Ital. Biol. Speriment. 29, 6, 1953. 9) Kemali D., Porcellati G.: j. w. 28, 6, 1952. 10) Logothetis J.: Neurology 5, 11, 1955. 11) Machebeuf M., Dubert J., Rebeyrothe P.: Bull. Soc. Chim. Biol. 35, 1953. 12) Priorr A. P., Whitehead T. P.: Nature 172, 4371, 1953. 13) Reitman F., Hulme W., Thomas B. J.: of Mental Science 100, 418, 1954. 14) Schönnenberg H.: Zeitschr. für Kinderheilkunde 73, 11, 1953. 15) Schlögel K., Siegel A.: Zeitschr. Physiol. Chem. 292, 263, 1953. 16) Torre M., Scarzella R., Zonalda A.: Minerva Medica 44, 55, 1953. 17) Torre M., Scarzella R., Zonalda A.: Boll. Della Soc. Ital. Di Biol. Speriment. 29, 2, 1953, oraz Nr 31, 12, 1955. 18) Walker B. S., Felles N. C., Pastore E. J.: A.M.A. Archives of Neurology and Psychiatry 73, 2, 1955. 19) Wieland T., Bauer L., Angew. Chem. 63, 1951. 20) Williams R., Kirby H. M.: Science 107, 481, 1948.

E. MAЗУРЧАК

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СВОБОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ В ЦЕРЕБРОСПИНАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ СОБАК МЕТОДОМ ИОНОФОРЕЗА И ХРОМАТОГРАФИИ

Путем субокципитального прокола получали 5 мл спинномозговой жидкости к исследованиям. Сначала проводили ионофорезный раздел, получая три группы аминокислот — кислую, щелочную и нейтральную а затем применяли хрома ографический анализ.

С кислых аминокислот определено — аспарагиновую и глютаминовую, с нейтральных — глицин, серин, треонин, аланин, валин, фенилаланин, лейцин и пролин, с щелочных — аргинин, лизин, гистидин. Кроме этого на ионограммах выступили следы в кислотной группе цистеина а в нейтральной группе — аминокислоты. Всего определено 15 аминокислот. Метод ионофореза и хроматографии для исследования спинномозговой жидкости полностью пригодный без применения специальных хроматографических методов. В качественном состоянии аминокислот у исследованных собак не определено изменений.

JERZY MAZURCZAK

DETERMINATION OF FREE AMINOACIDS IN THE CEREBRO-SPINAL FLUID OF DOGS USING THE METHOD OF IONOPHORESIS AND PAPER CHROMATOGRAPHY

Summary

The aim of this work was qualitative determination of free aminoacids present in the cerebro-spinal fluid of normal dogs. Five ml. of the cerebro-spinal fluid were collected by suboccipital puncture.

Examinations were conducted by the use of the ionophoretic and paper chromatography methods. Following initial preparation of the examined samples three groups, acid, neutral and basic were isolated

by ionophoresis. The separate fractions were examined by the use of the paper chromatography method.

In the group of acid aminoacids were identified: asparagine acid and glutamine. In the group of neutral aminoacids were identified: glycine, serine, threonine, alanine, valine, phenylalanine, leucine and proline. In the group of basic aminoacids were identified: arginine, lysine and histidine. Besides the above mentioned in the iograms of the acid group there were traces of cysteine, which could not be identified by the chromatographic method, in the group of neutral aminoacids there was not completely identified beta aminobutyric acid. Totally 15 aminoacids were isolated.

The determination of free aminoacids in the cerebrospinal fluid by the use of ionophoresis in conjunction with one dimensional chromatography permits to eliminate the tiresome two dimensional chromatography method and the secondary one, thus shortens considerably the time required for the analysis.

The qualitative constitution of the aminoacids in dogs showed no fluctuations.

JAN SZURMAN

POZIOM FRAKCJI BIAŁKOWYCH SUROWIC ŚWIŃ *

Instytut Weterynarii Pracownia Badań nad Chorobą Cieszyńską Świń Gumna k/Cieszyna
Kierownik: Z. LARSKI

Próby uchwycenia zmian w surowicy świń, po wprowadzeniu antygenu — wirusa choroby cieszyńskiej — wykazały konieczność określenia na wstępie zmian, powodowanych czynnikami niespecyficznymi.

Ponieważ do doświadczeń z wirusem choroby cieszyńskiej używano przeważnie świń w wieku od 35 do 77 dni, podjęto próbę uchwycenia zmian frakcji białkowych w zależności od wieku. Dane terenowe oraz wyniki uzyskane w naszej pracowni (1), wskazujące na ewentualną zależność przebiegu infekcji od sposobu żywienia, wskazały celowość przeprowadzenia prób nad zmianami białek surowicy, powodowanych zróżnicowanym żywieniem.

Materiały i metodyka

Zwierzęta doświadczalne: 1) świnia puławska z gospodarstwa doświadczalnego PAN Kostkowie (Cieszyn). Żywienie: śruta jęczmienna 40%, śruta owsiana 38%, makuch lniany 2%, otręby pszenne 16%, drożdże suszone 2%, susz lucerny 2%. 1 kg paszy zawiera: jednostek owsianych 1,072, strawnego białka g 87,5, gramów strawnego białka na 1 jednostkę karmową owsianą 81.

Dokarmianie prosiąt młodych na dzień i sztukę w kg.

	mleko	mieszanka treściwa
21 dni	0,11	0,01
28 „	0,21	0,04
35 „	0,35	0,08
42 „	0,59	0,21
49 „	0,81	0,40
56 „	0,95	0,59

*) współpraca techniczna Janina Larska, technik wet.