

Catedra de chimie organică de la Facultatea de farmacie a I.M.F. din Tg.-Mureș
(cond.: conf. A. Kiss), în colaborare cu Baza de cercetări științifice
a Academiei R.P.R. Tg.-Mureș

STUDIUL CROMATOGRAFIC AL AMINOACIZILOR CEREBRALI IN ENCEFALOMIELITA ALERGICĂ EXPERIMENTALĂ

A. Kiss, Ana Eperjessy, Viorica Kovács, T. Feszt

Pe lângă studiul aminoacizilor, care au un rol specific în activitatea sistemului nervos, prezintă interes și cercetarea modificărilor calitative și cantitative ale acelor aminoacizi care reflectă tulburările metabolismului proteic, survenite în diferite condiții patologice. În afară de cercetările efectuate pentru urmărirea incorporării aminoacizilor marcați în proteinele cerebrale, multe investigații s-au ocupat cu studiul modificărilor cantitative și calitative ale aminoacizilor liberi și structurali din creier, în diferite condiții experimentale sau în diferite boli neuro-psihiatrice. Astfel *Barmina* (1) a studiat metabolismul aminoacizilor cerebrali la șobolani iradiati, negăsind nici o modificare. *Knauff* și *Böck* (13), *De Ropp* și

Snedecker (5) în cursul hipoglicemiei și mai ales în stări comatoase postinsulinice au observat scăderea cantitativă a aminoacizilor liberi. *Potop și Ciocirdia* (19) au descris schimbări în numărul aminoacizilor în hidrolizatul de creier la șobolani, sub influența administrării tiroxinei și a alkironului, iar *Gheorghiu și colab.* (10) sub acțiunea administrării cronice de clorpromazină. *Wertheimer—Luca* (21) a demonstrat, în accese convulsive experimentale, modificări în concentrația aminoacizilor liberi în organele șobolanilor. După cercetările lui *Goliș și Siceva* (12) în diferite afecțiuni ale sistemului nervos, compoziția calitativă și cantitativă a aminoacizilor din l.c.r. se modifică în mod semnificativ și caracteristic. După datele lui *Popescu și Drăgănescu* (18) în encefalite precum și în afecțiuni demielinizante, aminoacizii liberi din sânge se mențin la un nivel ridicat față de martori.

Benetato și colab. (2) au atras atenția asupra vicierei metabolismului proteic în cursul encefalomielitei alergice experimentale, (EAE) fapt care a fost confirmat și de colectivul nostru (6, 7, 8, 9, 14, 15). În continuarea acestor cercetări și pentru a aprofunda observațiile asupra tulburărilor metabolismului protidic cerebral, am studiat prin metoda cromatografiei pe hîrtie mono- și bidimensională, aminoacizii liberi și structurali ai țesutului cerebral, precum și ai lipoproteidelor izolate, la iepuri supuși unui tratament cu complex de antigen encefalitogen.

Material și metodă

Experiențele au fost efectuate pe 30 de iepuri cărora le-am provocat encefalomielită prin administrare de vaccin antipertussis și a unui antigen encefalitogen preparat după tehnica descrisă în unele lucrări precedente (11, 15). Inoculările au fost repetate săptămînal, în cursul experiențelor care au durat 32 zile.

Aminoacizii liberi i-am determinat din filtratul deproteinizat al țesutului cerebral cu metoda: *Dubreuil și Timiras* (4).

Aminoacizii structurali i-am determinat din hidrolizatul țesutului cerebral. Din creierul recoltat în alcool 80%, după uscare pe hîrtie de filtru, am cîntărit 0.1 g și am hidrolizat cu 10 ml 6 N/HCl timp de 24 ore în fiole. Pentru eliminarea sărurilor minerale am evaporat HCl din hidrolizat pînă la siccitate, am adăugat 10 ml apă b. d. repetînd operația de trei ori.

Lipoproteinele cerebrale extrase prin metoda Machebouef modificată de noi (7), au fost degresate cu un amestec de alcool-eter 1:2, iar 0,02 g din substanța uscată a fost hidrolizată timp de 24 ore cu 10 ml 6 N/HCl. Aminoacizii i-am determinat din hidrolizatul demineralizat.

Am efectuat cromatografia mono- și bidimensională ascendentă și descendentă pe hîrtie de filtru Whatman nr. 1. În prima dimensiune am utilizat ca solvent n-alcool butilic, acid acetic glacial, apă în proporție de 4:1:1; în dimensiunea a doua, soluția a fost fenol saturat cu apă.

Rezultate

Rezultatele experiențelor le prezentăm în tabelul anexat. Din datele tabelului se constată că în urma administrării complexului de antigen encefalitogen se observă modificări însemnate, în comparație cu rezultatele obținute pe creierul normal. Modificările se manifestă în schimbarea spectrului aminoacidic, în creșterea numărului de aminoacizi liberi și structurali, decelabili în condițiile experiențelor noastre. Astfel, în creierul animalelor martore am identificat 9 aminoacizi liberi, iar la animalele cu EAE 13. În creierul animalelor cu EAE am identificat 7 aminoacizi în plus: alanină, cistină, cisteină, citrulină, leucină, n-leucină și tirozină; în acest lot au lipsit trei aminoacizi: arginina, ornitina și triptofanul, găsiți la martori. În urma hidrolizei cu acid clorhidric, din creierul iepurilor martori am separat un număr de 15 aminoacizi, iar la animalele cu EAE 19, deci am identificat 4 aminoacizi în plus și anume: arginina, histidina, prolina și triptofanul. Este de remarcant faptul că în fiecare lot numărul aminoacizilor structurali a fost mai mare decît numărul aminoacizilor liberi și acest raport a persistat și la iepurii

Tabelul nr. 1.

Aminoacizi		Aminoacizi					
		liberi		după hidrolizare		după hidrolizare din lipoproteide	
		martori	EAE	martori	EAE	martori	EAE
1.	Cistină	—	+	+	+	—	—
2.	Acid aspartic	+	+	+	+	—	—
3.	Acid glutamic	+	+	+	+	+	+
4.	Serină	+	+	+	+	+	+
5.	Glicocol	+	+	+	+	+	+
6.	Cisteină	+	+	+	+	+	+
7.	Treonină	+	+	+	+	+	+
8.	Tirozină	—	+	+	+	+	+
9.	Alanină	—	+	+	+	+	+
10.	Triptofan	+	—	—	+	—	—
11.	Valină	—	—	—	—	+	+
12.	Fenilalanină	—	—	—	—	+	+
13.	Leucină	—	+	+	+	+	+
14.	Histidină	—	—	—	+	+	+
15.	Lizină	—	—	+	+	+	+
16.	Arginină	+	—	—	+	—	+
17.	Ornitină	+	—	+	+	—	+
18.	Oxiprolină	—	—	+	+	—	+
19.	Prolină	—	—	—	+	—	+
20.	Metionină	—	—	+	+	—	+
21.	n-Leucină	—	+	+	+	—	+
22.	Citrulină	—	+	—	—	—	—
Total		9	13	15	19	10	15

cu EAE. Astfel aminoacizii liberi la animalele cu EAE se asemănau mult cu aminoacizii structurali găsiți la animalele martor, atât ca număr cit și ca spectru.

În timp ce lipoproteidele cerebrale ale martorilor conțin 10 aminoacizi decelabili, la animalele encefalomielitice am pus în evidență 15 aminoacizi.

Discuții

Cercetările efectuate pe iepuri ne probează că în cursul EAE, în creierul animalelor, componența aminoacizilor suferă modificări deosebite. Aceste modificări pot surveni în urma permeabilității crescute a barierei hematoencefalice, pot fi rezultatul vicierei metabolismului proteic, sau al denaturării proteinelor cerebrale.

În creier, concentrația aminoacizilor liberi este relativ ridicată, totuși aminoacizii administrați parenteral se încorporează numai într-o mică măsură în proteinele cerebrale, din cauza activității barierei hematoencefalice. În cazul EAE, precum și în reacțiile alergice în general, crește permeabilitatea capilarelor. Permeabilitatea vaselor este îndeosebi pronunțată în teritoriile inflamate și granulomatoase, dând posibilitate aminoacizilor din sânge să pătrundă în țesutul înconjurător, măbind concentrația și modificând compoziția aminoacizilor liberi din țesutul cerebral.

Creșterea numărului și modificarea spectrului aminoacizilor liberi și structurali, exprimă și vicierea metabolismului proteinelor cerebrale. Condițiile în care aminoacizii sînt utilizați într-un grad mai redus în sinteza proteinelor, precum și acela în care crește degradarea proteinelor tisulare, duc la creșterea numărului și cantității acizilor aminați. Aminoacizii liberi reprezintă sursa pentru sinteza

proteinelor celulare. Paralel cu scăderea vitezei de încorporare în proteine a aminoacizilor, crește și numărul și cantitatea acizilor aminați liberi. Sinteza viciată a proteinelor poate modifica și spectrul aminoacizilor structurali în proteinele tisulare. Cercetările lui *Paladin* (16), *Clouet* și *Richter* (3) au arătat că aminoacizii marcați se încorporează cel mai repede în proteinele din fracțiunea microsomică, respectiv în substanța tigroidă Nissl a celulelor nervoase. În cursul EAE cromatofilia celulelor nervoase scade și conform cercetărilor noastre (15) tigroliza intervine chiar și în fazele incipiente ale bolii. Tulburarea metabolismului aminoacizilor poate fi pusă în legătură cu dispariția granulelor tigroide.

Modificările descrise în compoziția aminoacizilor pot reflecta și modificările structurale, respectiv denaturarea proteinelor cerebrale, survenite în cursul EAE. Proteinele cerebrale denaturate pot avea un caracter autoantigenic și prin acesta pot avea un rol în menținerea bolii. Considerăm demn de relevat că, compoziția aminoacidică a lipoproteinelor cerebrale la animalele encefalomielitice prezintă o concordanță numerică cu compoziția aminoacidică a unei fracțiuni extrasă din măduva spinării de la bovine de către *Roboz* și *Henderson* (20), fiind înzestrată cu o însușire encefalitogenă foarte eficientă.

Sosit la redacție: 19 octombrie 1964.

Bibliografie

1. BARMINA M.: Vopr. Med. Himii (1962), 8, 553; 2. BENETATO GR. și colab.: Stud. cercet. med. Cluj (1959), 10, 17; Stud. cercet. fiziol. (1960) 5, 9; (1961), 6, 207; Fiziologia norm. și patol. (1961), 7, 73; 3. CLOUET D. H., RICHTER D. J.: J. Neurochem. (1959), 3, 219; 4. DUBREUIL R., TIMIRAS P. S.: Am J. Physiol. (1953), 174, 20; 5. DE ROPP R. S., SNEDECKER E. H.: J. Neurochem. (1961), 7, 128; 6. EPERJESSY A., FESZT T., BLAZSEK V., KISS A.: Revista med. (1963), 9, 417; 7. EPERJESSY A., KISS A., ADAM S., GYERGYAY F., FESZT T.: Revue des sciences médicales (1963), 8, 25; 8. FESZT T., KISS A., EPERJESSY A., KOVÁCS V.: Studii cercet. neurol. (1964), 9, 309; 9. FESZT T., SZABÓ ȘT., MÓDY E., SZEKELY I.: Rev. medicală (1964), 10, 67; 10. GHEORGHIU P., SCHWARZ R., STROESCU V., POPESCU E.: Stud. cercet. fiziol. (1962), 7, 161; 11. GYERGYAY F., FESZT T., POZSGI N., WAITSUK P., MISKOLCZY D.: Studii și cercet. științ. med. Iași, (1963), 14, 79; 12. GOLİȘ N. N., SICEVA N. G.: J. Nevropat. Korsakov (1960), 60, 1153; 13. KNAUFF H. G., BÖCK F.: Klin. Wschr. (1960), 38, 553; J. Neurochem. (1961), 6, 171; 14. KOVÁCS A., KEREKES M., FESZT T., GYERGYAY F.: Comunicările Acad. R.P.R. (1963), 13, 463; 15. MISKOLCZY D. și colab.: Stud. cercet. științ. med. Iași (1960), 11, 257; Medicina experimentală (1963), 9, 307; 16. PALLADIN A. V.: Studii și cercet. biochim. (1963), 6, 9; 17. PALLADIN A. V., BELIK I. V., KRACIK L. S.: DAN SSSR (1959), 127, 702; 18. POPESCU M., DRĂGĂNESCU ȘT.: Stud. cercet. neurol. (1961), 6, 571; 19. POTOP I., CIOCIRDA C.: Stud. cercet. endocrin. (1958), 9, 77; 20. ROBOZ E., HENDERSON N.: în cartea „Allergis Encephalomyelitis“ ed. Thomas, Springfield 1959, p. 281; 21. WERTHEIMER-LUCA N.: Stud. cercet. neurol. (1957), 2, 413; (1958), 3, 211.