

Academia de științe medicale, Centrul de cercetări medicale (cond.: prof. dr. L. Csögör, doctor-docent, membru al Academiei de științe medicale), Clinica de neurologie (cond.: prof. dr. L. Popoviciu, doctor în medicină) din Tîrgu Mureș

STUDIUL CALITATIV AL AMINOACIZILOR LIBERI ÎN SCLEROZA MULTIPLĂ

dr. T. Becuș, dr. Ana Eperjessy, Maria Ardelean

În patologia sistemului nervos se cunosc o serie de afecțiuni caracterizate printr-o tulburare de natură enzimatică a metabolismului unor aminoacizi (7, 15, 16, 24, 26), cât și modificări ale acestora într-o serie de afecțiuni neuropsihice, fără să se poată explica semnificația lor (11, 12, 21, 25, 27, 29, 31, 32, 33, 34, 35).

Numărul relativ redus de lucrări referitoare la modificările aminoacizilor liberi în scleroza multiplă (S. M.) ca și limitarea lor la studiul unui singur lichid biologic (1, 9, 28, 36) ne-a determinat să aprofundăm cunoașterea tulburărilor metabolismului proteic în această afecțiune, să stabilim o corelație între modificările aminoacizilor liberi din ser, lichidul cefalorahidian (L.C.R.) și urină, precum și găsirea unor modificări utilizabile în diagnosticul bolii.

Material și metodă

Studiul aminoacizilor liberi s-a efectuat din serul, L.C.R.-ul și urina provenită de la 15 bolnavi cu S.M. și de la un lot de 15 bolnavi cu alte afecțiuni neurologice, internați în Clinica neurologică din Tîrgu Mureș, în anul 1970. Drept control ne-au servit lichidele biologice obținute de la 5 persoane sănătoase.

* Lucrarea prezentată la Sesiunea anuală de comunicări a Centrului de cercetări medicale Tîrgu Mureș. al Academiei de științe medicale, 14—15 ianuarie 1971.

Am utilizat metoda cromatografiei ascendente pe hartie Whatman nr. 1, mono- și bidimensională cu dublă irigare. Identificarea aminoacizilor liberi s-a făcut prin compararea cu valorile Rf-urilor (cromatografie monodimensională) și cu harta aminoacizilor liberi cunoscuți (cromatografie bidimensională). În vederea evidențierii aminoacizilor liberi am îndepărtat proteinele (precipitare cu alcool 96%), lipidele (extragere cu eter), sărurile anorganice (eluări cu apă bidistilată și evaporări repetate la vid), iar din urină și carbamidă (cu urează). Soluțiile astfel purificate au fost evaporate la sec și păstrate în exicator. Extractul sec a fost prelucrat apoi cu apă bidistilată (1/10 din volumul inițial în cazul L.C.R.-ului și serului și 1 ml pentru urină) și utilizat pentru cromatografie.

La cromatografia monodimensională am utilizat ca sistem de dezvoltare amestecul de N-alcool butilic-acid acetic glacial-apă bidistilată, în proporție de 4:1:1 la pH=1, identificarea aminoacizilor liberi făcându-se cu o soluție alcoolică de ninhidrină 0,4%. La cromatografia bidimensională am utilizat pentru dezvoltare în prima dimensiune amestecul de solvenți de mai sus, iar în dimensiunea a doua fenol redistilat saturat cu apă (80:20). Dezvoltarea s-a efectuat cu o soluție de ninhidrină 1% în alcool de 96° (5, 31).

Rezultate

Analizând sinoptic rezultatele determinărilor noastre calitative am observat în serul, L.C.R.-ul și urina bolnavilor cu S.M. — ca și la cei cu alte afecțiuni neurologice — variații ale spectrului aminoacizilor liberi și a numărului lor total în fiecare caz în parte. Aceste modificări sînt mai exprimate la cele 2 loturi de bolnavi, în comparație cu grupul persoanelor sănătoase. De asemenea se observă că numărul cel mai mare de aminoacizi s-a evidențiat în ser și urină, iar cel mai mic în L.C.R., analiza individuală a cazurilor neconfirmînd totdeauna această regulă.

Din datele cuprinse în tabelul nr. 1 se poate constata creșterea numărului de aminoacizi liberi în cele 3 lichide biologice la bolnavii cu S.M., și la cei cu alte afecțiuni neurologice, comparativ cu persoanele sănătoase.

Făcînd o medie a numărului de aminoacizi liberi găsiți în ser, L.C.R. și urină la bolnavii cu S.M. se obțin următoarele valori: 11,6; 10,5; 12,7, valori care sînt net mai ridicate decît la persoanele sănătoase (9,4; 6,6; 10,6) și chiar decît la bolnavii cu alte afecțiuni neurologice, cu excepția urinei (9,2; 9,06; 13,6).

Analizînd frecvența cu care apar diferiți aminoacizi liberi la cele trei loturi studiate (tabelul nr. 2), se observă că la grupul bolnavilor cu S.M. s-au putut pune în evidență toți cei 23 de aminoacizi liberi studiați. În cele trei lichide biologice, la bolnavii cu S.M., cu cea mai mare frecvență au fost prezenți următorii aminoacizi liberi: cistina, acidul aspartic+asparagina, cisteina, alanina, fenilalanina, leucina+izoleucina, histidina, arginina, prolina și norleucina. Mai puțin frecvenți au fost acidul glutamic+glutamina, serina, glicina, lizina, ornitina și citrulina. La lotul de bolnavi cu alte afecțiuni neurologice cei mai frecvenți aminoacizi liberi au fost următorii: cistina, cisteina, alanina, fenilalanina și norleucina, mai puțin frecvenți: leucina+izoleucina, histidina, lizina, arginina și metionina. Se constată deci frecvența mai mare în S.M., în comparație cu lotul bolnavilor cu alte afecțiuni neurologice, a acidului aspartic+asparagina, a acidului glutamic+glutamina, a serinei, ornitinei, prolinei, citrulinei și frecvența mai mică a metioninei. La grupa persoanelor sănătoase am pus în evidență mai frecvent cistina, serina, glicina, cisteina, lizina, arginina și ornitina, aminoacizi liberi prezenți cu frecvență mare și la grupul bolnavilor cu S.M. La aceștia din urmă au mai fost prezenți cu mare frecvență și alți aminoacizi liberi ca: acidul aspartic+asparagina, acidul glutamic+glutamina, alanina, fenilalanina, leucina+izoleucina, histidina, prolina, norleucina și citrulina.

Tabela nr. 1

Numărul amonoacizilor liberi din serul, L.C.R.-ul și urina bolnavilor cu scleroza multiplă, cu alte afecțiuni neurologice și a persoanelor sănătoase

Nr. cri.	Scleroza multipla	Nr. Am. Ac. liberi			Alte afecțiuni neurologice	Nr. Am. Ac. liberi			Persoane sănătoase	Nr. Am. Ac. liberi		
		Ser	L.C.R.	Urina		Ser	L.C.R.	Urina		Ser	L.C.R.	Urina
1.	Scleroza multipla	10	8	18	L.E.S.S.	9	7	14	Persoane sănătoase	6	6	11
2.	"	12	10	8	Encefal. mioclonică	11	7	13	"	10	8	12
3.	"	13	13	14	Poliradiculonevr.	11	9	14	"	10	6	10
4.	"	9	12	15	"	10	10	13	"	11	6	11
5.	"	12	9	13	"	6	8	13	"	10	7	9
6.	"	13	11	12	Poliomieli. ant. subac.	10	9	12	"			
7.	"	12	6	11	Sdr. miast. postencef.	5	8	12				
8.	"	14	12	15	B. Friedreich	7	7	11				
9.	"	9	10	7	"	8	8	14				
10.	"	9	8	11	Coree cronică	15	16	16				
11.	"	8	14	13	Epilepsie majoră	8	13	13				
12.	"	16	13	14	"	10	10	11				
13.	"	12	11	14	As. Cerebr. cu I.V.B.	10	6	14				
14.	"	14	13	14	Sdr. de S.L.A. vasc.	11	7	16				
15.	"	11	8	12	Etilism cr. hemip. dr.	8	11	13				
Media		11,6	10,5	12,7		9,2	9,06	13,6		9,4	6,6	10,6

Prin metoda utilizată am evidențiat, mai ales la bolnavii cu S.M. și cu alte afecțiuni neurologice, o componentă ninhidrin pozitivă care în urma hidrolizei s-a dovedit a fi un compus poliglutamic.

Discuții și concluzii

În legătură cu modificările descrise în spectrul aminoacizilor liberi se ridică întrebarea care este semnificația biologică a acestor modificări, ce legătură se poate face între ele și tulburările cunoscute ale metabolismului proteic în S.M. și în general cum pot fi ele încadrate în tabloul patofuncțional al bolii?

Pe baza datelor din literatură se știe că menținerea unui nivel constant al aminoacizilor liberi plasmatici se datorește intervenției a doi factori: hepatic, care printr-o dezaminare eficientă scade nivelul lor și renal, care prin creșterea reabsorbției lor tubulare previne diminuarea lor (7, 8, 10). Existența unor leziuni hepatice și renale va avea ca și consecință creșterea nivelului lor plasmatic și eliminarea crescută în urină (4, 14, 23).

În S.M. aminoacizii liberi din ser au fost studiați cromatografic de către *Po-pescu* și *Drăgănescu* (28) și de către *Duma* și colab. (9). Printr-o evaluare semicantitativă acești autori semnalează creșterea nivelului unor aminoacizi și scăderea altora. Aminoacizii liberi crescuți, găsiți de autorii mai sus citați, sînt prezenți cu o frecvență mai mare și la cazurile noastre.

Aceste creșteri se pot explica prin intensificarea catabolismului proteic, care conform datelor histochemice ale lui *Benetato* și colab. (2) precede și însoțește procesul de demielinizare. Se mai poate presupune ca un mecanism al creșterii aminoacizilor liberi plasmatici și o utilizare redusă a lor în sinteza proteinelor, precum și creșterea activității unor enzime cum sînt transaminazele, a căror valori le-am găsit crescute — ca și alți autori — în serul acestor bolnavi (9, 15, 28). Deoarece în S.M. nu există o atingere primară a funcției renale, iar modificările funcționale hepatice sînt minime, se poate presupune că apariția unor aminoacizi în urină se datorește creșterii lor plasmatiche și tulburărilor secundare ale funcției renale.

Deși lucrările lui *Kazmeier* (17) și *Schöenberg* (30) au dovedit identitatea calitativă a proteinelor din ser și L.C.R. în privința compoziției lor în aminoacizi, intervenția activă a barierei hematoencefalice (B.H.E.) determină existența unor diferențe între concentrația aminoacizilor liberi în L.C.R. și ser. Diferențele dintre permeabilitatea barierei cefalo-lichidiene pe de o parte și a barierei hematoencefalice și hematolichidiene pe de altă parte, explică asemănarea L.C.R.-lui — din punctul de vedere al conținutului în aminoacizi — mai mult cu lichidul intercelular al sistemului nervos central (S.N.C.), decît cu serul (22).

Walker și colab. (36), studiind aminoacizii liberi din L.C.R., nu au găsit deosebiri calitative și cantitative utilizabile pentru diagnostic între cromatogramele lichidiene ale bolnavilor cu S.M. și cu alte afecțiuni neurologice. *Bauer* și *Boesche* (1) au pus în evidență în L.C.R.-ul bolnavilor cu S.M. mai frecvent — comparativ cu lotul martor — următorii aminoacizi liberi: glicina, acidul aspartic și cisteina. Cercetările noastre arată de asemenea modificări ale frecvenței aminoacizilor liberi din L.C.R.-ul bolnavilor cu S.M., comparativ cu lotul martor, diferențele fiind mai evidente în privința acidului aspartic+asparaginei, acidului glutamic+glutaminei, histidinei și citrulinei.

S-au mai descris modificări ale aminoacizilor liberi din L.C.R. și în alte afecțiuni neurologice, unele din ele cu valoare diagnostică. Astfel *Haris* (13) a găsit încă în 1943 valori ridicate ale glutaminei în neuroleues. De asemenea se citează creșterea fenilalaninei în oligofrenia fenilpiruvică (3), scăderea gluaminei în meningite (33), creșterea acidului aspartic în ataxia cerebeloasă ereditară (18, 20), creșterea glicinei, serinei, treoninei, cisteinei și metioninei și scăderea acidului glutamic în boala Parkinson (6) etc.

Modificările aminoacizilor liberi din L.C.R.-ul bolnavilor cu S.M. sînt dificil de interpretat. Cu siguranță un rol important îl joacă intensificarea degradării proteinelor cerebrale ca și perturbările permeabilității B.H.E., ceea ce permite pă-

trunderea aminoacizilor în L.C.R. cu creșterea numărului și cantității lor. Mai intervine probabil și intensificarea activității unor enzime proteolitice din L.C.R. (19), cu descompunerea proteinelor lichidiene. Dar aceste modificări ale spectrului aminoacizilor liberi din L.C.R. nu pot constitui o dovadă diagnostică în favoarea S.M., ele fiind un fenomen care însoțește degradarea proteinelor cerebrale și perturbarea metabolismului proteic în general.

Ca o concluzie generală putem afirma că în S.M. există modificări ale spectrului aminoacizilor liberi din ser, L.C.R. și urină, modificări care nu sînt specifice și care contribuie la cunoașterea mai aprofundată a patogeniei acestei afecțiuni, confirmînd existența tulburării metabolismului proteic. În cursul cercetărilor noastre, este demn de remarcat apariția unui polipeptid glutamat în serul și L.C.R.-ul bolnavilor cu S.M. și cu alte afecțiuni neurologice (52 % a cazurilor), care nu s-a pus în evidență la persoanele sănătoase.

Sosit la redacție: 6 iunie 1971.

Bibliografie

1. BAUER H., BOESCHE P.: *Klin. Wschr.* (1957), 35, 511; 2. BENETAT GR., GABRIELESCU E., PARTENIE L., BOROS I., BORDEIANU A.: *St. cerc. fiziol.* (1960), 5, 9; 3. BOREK E., BRECHER A., JERVIS G. A., WOELSCH H.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* (1950), 9, 338; 4. BRAUNER R., SCRU E., TĂNĂȘESCU D., GEORGESCU V.: *Med. Int.* (1958), 10, 1617; 5. BRAUN P., KISFALUDY S., DUBOKY M.: *Orv. Hetil.* (1954), 25, 682; 6. BRUCK H., GERSTENBREND F., GRUENDIG E., TEUFLMAYR R.: *Acta neuropathol.* (1964), 3, 638; 7. CHISOLM J.: *J. Pediatr.* (1959), 55, 303; 8. DOOLAN P. D., HARPER H. A., HUTCHIN M. E., SHREEVE W. W.: *J. Clin. Invest.* (1955), 34, 1247; 9. DUMA D., POPOVICIU L., GRECU F., MANTA I., LAZAR T., PROINOV I., PÎRVU M., CĂTANA R., COMES S.: *Rev. Roum. Neurol.* (1964), 1, 309; 10. EVERSON T. C., FRITCHEL M. J.: *Surgery* (1952), 31, 226; 11. GERSTEMBRAND T.: *Wien Z. Nervenheilk.* (1966), suppl. 1, 130; 12. GRUNDIG E.: *Wien Klin. Wschr.* (1965), 77, 246; 13. HARIS M. M., ROTH R. T., HARIS R. S.: *J. Clin. Invest.* (1943), 22, 559; 14. IBER L. F., ROSEN H., STANLEY M., LEVENSON S., THOMAS C. C.: *J. Lab. Clin. Med.* (1957), 50, 417; 15. IONĂȘESCU V.: *Tulburările metabolice în bolile neuropsihice*. Ed. Acad. R.S.R. București, 1967, 61; 16. JOB J. C., BURI J. F.: *Arch. Franc. Pédiat.* (1963), 20, 47; 17. KAZMEIER F.: *Z. Klin. Med.* (1953), 151, 101; 18. KENALI D.: *Acta Neurol. (Napoli)*, (1954), 9, 358; 19. KOVÁCS A., WAITSUK P., KEREKES M., FESZT T., MISKOLCZY D.: *Neurol.* (1963), 8, 315; 20. LOGOTHETIS J., BOWIS M.: *World Neurol.* (1958), 8, 299; 21. LOGOTHETIS J.: *Neurol. (Mineapolis)* (1955), 5, 767; 22. MANERY J. F.: *Anorganic Metabolism of the Brain. Biology of Mental Health and Disease*. Hoeber New York, 1952, 124; 23. MARDARE C., STRAT C., DRĂGAN M., RUSU G., BOINGEANU A., STANCIU C., TRIANDAF M.: *Med. Int.* (1970), 22, 115; 24. MALLEIN R.: *Rev. Lyon. Med.* (1965), 14, 1; 25. MAKAO K., TERAU T., MOZAI T.: *Clin. Neurol. (Tokyo)*, (1965), 5, 145; 26. NINA A. J., CARSON M. D.: *Acta Neurol. Belg.* (1968), 68, 231; 27. PERRY T. L., HANSEN S., DIAMOND S., STEDMAN D.: *Lancet* (1969), 1, 7599, 806; 28. POPESCU M., DRĂGĂNESCU ȘT.: *St. cerc. neurol.* (1961), 6, 571; 29. SKHIAVINI A. C., NEBBIA L.: *Min. Ped.* (1957), 48, 1486; 30. SCHONENBERG H.: *Nervenarzt.* (1956), 27, 54; 31. SIMISI C., COLUCCI D'AMOTO F.: *Acta Neurol. (Napoli)*, (1966), 21, 265; 32. SZUKALSKI B.: *Pediat. Pol.* (1965), 40, 721; 33. TAKEHARA K., KAWAGUCHI K., SUZUKI H.: *Am. Rep. Res. Inst. Environ. Med.* (1961), 9, 1; 34. TASIMA H.: *J. Nagasaki Med. Ass.* (1964), 39, 389; 35. VISAKORPI J. K., WASZHOERKERT O., TOERMAE T.: *Ann. Paediat. Fenn.* (1964), 24, 2; 36. WALKER B. S., TELLES H. C., PASTORE E. J.: *Arch. Neurol. Psychiat. (Chic.)*, (1955), 73, 149; 37. WERNER M.: *Der Zuchter.* (1954), 11, 24.