

Zakład Biochemii, Wydział Farmaceutyczny, Akademia Medyczna w Lublinie
Kierownik: doc. dr Marian Szymona

Halina KOWALSKA-PYŁKA

**Badania nad aminoacidurią u szczurów w nerczycy doświadczalnej
wywołanej aminonukleozydem (puromycyna) i chlorkiem rtęciowym**

Investigations on Aminoaciduria in Rats with Experimentally Induced
Nephrosis by Aminonucleoside (Puromycin) and Mercuric Chloride

Etiologia i patogenezę zespołu nerczycowego pomimo znacznego zainteresowania nie jest jeszcze całkowicie wyjaśniona. Również odnośnie aminoacidurii w tym schorzeniu poglądy poszczególnych autorów nie są zgodne. W niektórych przypadkach zespołu nerczycowego obserwowano hipoaminoacidurię (11, 19), w innych zawartość azotu aminowego w moczu pozostawała w granicach normy (16). Według niektórych autorów hiperaminoaciduria u pacjentów z zespołem nerczycowym może być następstwem wysokobiałkowej diety (18), podawaniem hydrolizatów białkowych, oraz leczenia hormonami (15). W badaniu nerczyc lipidowych u dzieci, Opieńska-Blauth i Kowalska (14) stwierdziły niezależnie od okresu choroby różne postaci aminoacidurii, tj. w niektórych przypadkach aminoacidurię fizjologiczną w innych hipo- i hiperaminoacidurię.

W celu wyjaśnienia patogenezę zespołu nerczycowego podejmowano próby wywołania tego zespołu u zwierząt za pomocą różnych czynników. Między innymi stosowano sublimat (12), autoimmunizację przy użyciu homologicznych zawiesin tkanki nerkowej (10) oraz odpowiednie heterologiczne antysurowice (5). W ostatnich latach zainteresowano się jedną z pochodnych antybiotyków puromycyny — aminonukleozydem (6-dwuetyloamino-9-3' aminodezoksy-D-rybofuranazylopuryną). Za pomocą tego związku udaje się uzyskać u szczurów nerczycę zbliżoną objawami klinicznymi do ludzkiej (2, 3, 4, 8). W obecnej pracy podjęto badania nad aminoacidurią u szczurów w nerczycach doświadczalnych wywołanych porównawczo sublimatem i aminonukleozydem.

MATERIAŁ I METODYKA

Do doświadczeń używano białe szczury (samce) szczepu „Wistar”, wagi 180—250 g. Zwierzęta karmiono standardową dietą produkowaną w Instytucie Leków w Warszawie — Ośrodek Hodowli Zwierząt Doświadczalnych. Zwierzęta trzymane pojedynczo w klatkach metabolicznych otrzymywały wodę i pożywienie

ad libitum. Przeciętny czas przebywania szczurów na diecie do chwili rozpoczęcia doświadczenia wynosił 14 dni. Mocz dobowy zbierano ilościowo do naczyń z tymolem.

Azot α -aminowy w moczu oznaczano metodą Spiera-Paschera (17). Do badań składu aminokwasowego moczu stosowano chromatografię dwukierunkową wstępującą. Próbkę moczu po odsoleniu na kationicie Amberlit IR 120 nanoszono na bibułę Whatman Nr 3 w ilości 0,001 objętość. moczu dobowego i rozwijano w następujących układach rozpuszczalników: propanol : woda (7 : 3), II-rz. butanol : 3% amoniak (150 : 60), II-rz. butanol : kwas mrówkowy : woda (150 : 30 : 20).

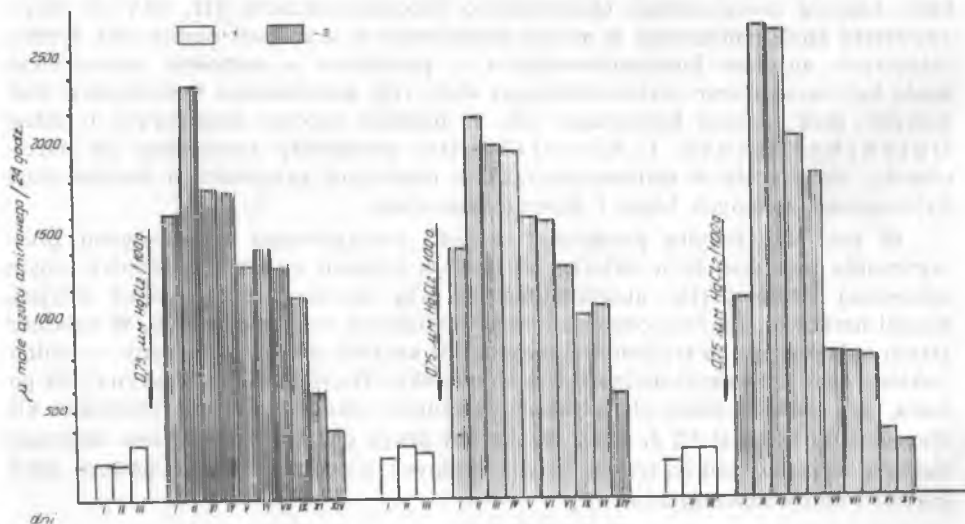
Dla oddzielenia seryny od glicyny zastosowano technikę elektrochromatografii (6, 7). Elektroforeza pH 2,2 w buforze kwaśnym, chromatografia w układzie I-rz. butanol — lodowaty kwas octowy — woda (4 : 1 : 1).

Chromatogramy i elektrochromatogramy wywoływano 0,2% acetonowym roztworem ninhydryny w temp. 60°C. Obecność białka w moczu wykazywano próbą z kwasem sulfosalicylowym.

BADANIA WŁASNE I WYNIKI

Nerczyca doświadczalna wywołana chlorkiem rtęciowym

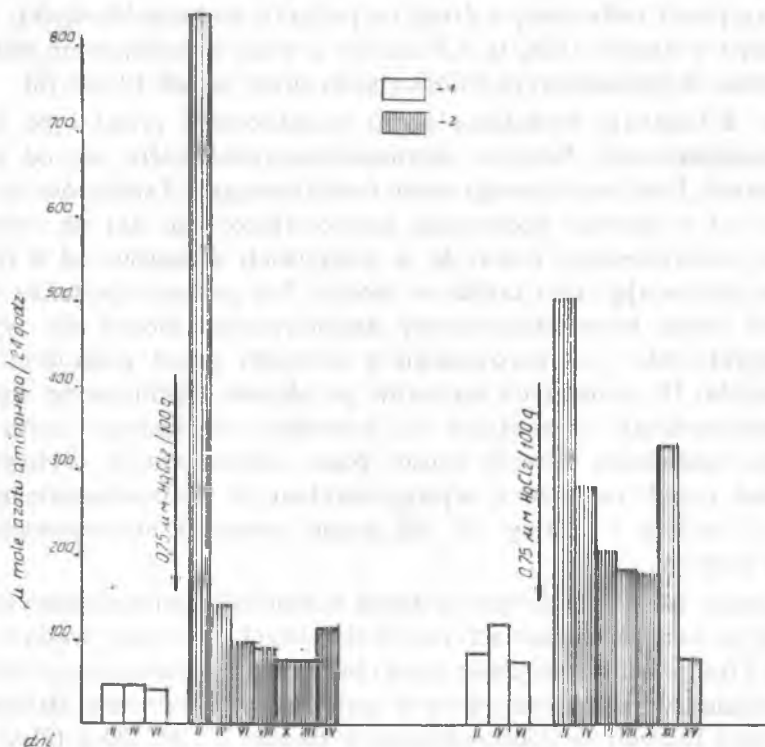
Badania przeprowadzono na 5 dorosłych białych szczurach. W dobowym moczu oznaczano azot α -aminowy, diurezę, białko oraz określano skład aminokwasowy. Badania obejmowały 2 okresy: pierwszy — przed



Ryc. 1. Wpływ chlorku rtęciowego na wydalanie azotu aminowego w moczu trzech szczurów; 1 — azot aminowy w moczu szczurów przed zatruciem chlorkiem rtęciowym, 2 — azot aminowy w moczu szczurów po zatruciu chlorkiem rtęciowym. The effect of mercuric chloride on the excretion of aminonitrogen in the urine of 3 rats; 1 — aminonitrogen in the urine of rats before poisoning with mercuric chloride, 2 — aminonitrogen in the urine of rats after poisoning with mercuric chloride

podaniem chlorku rtęciowego (3 lub 6 dni), drugi — po podaniu (15 dni). Chlorek rtęciowy w dawce $0,75 \mu\text{M}/100 \text{ g}$ wagi wstrzykiwano dootrzewnowo w jednej porcji jako 80 mg% roztwór w izotonicznym chlorku sodu ($0,25 \text{ ml}/100 \text{ g}$ wagi) (1).

Ryc. 1 i 2 przedstawia wydalanie azotu α -aminowego badanych szczurów. We wszystkich przypadkach podanie sublimatu wywołało wzrost wydalania azotu α -aminowego, osiągając maximum drugiego dnia po zatruciu. Ilości wydalanego wówczas azotu α -aminowego osiągają wartości nawet 20 razy większe w porównaniu ze stanem przed zatruciem. Powrót do poziomu normalnego obserwuje się 14 dnia od podania chlorku rtęciowego. W drugim dniu stwierdza się również największy wzrost diurezy i białkomoczu. Zmienia się także ilość i jakość wydalanych amino-



Ryc. 2. Wpływ chlorku rtęciowego na wydalanie azotu aminowego w moczu dwóch szczurów (oznaczenia wykonywano co drugi dzień); 1 — azot aminowy w moczu szczurów przed zatruciem chlorkiem rtęciowym, 2 — azot aminowy w moczu szczurów po zatruciu chlorkiem rtęciowym

The effect of mercuric chloride on the excretion of aminonitrogen in the urine of 2 rats (analyses performed every second day); 1 — aminonitrogen in the urine of rats before poisoning with mercuric chloride, 2 — aminonitrogen in the urine of rats after poisoning with mercuric chloride

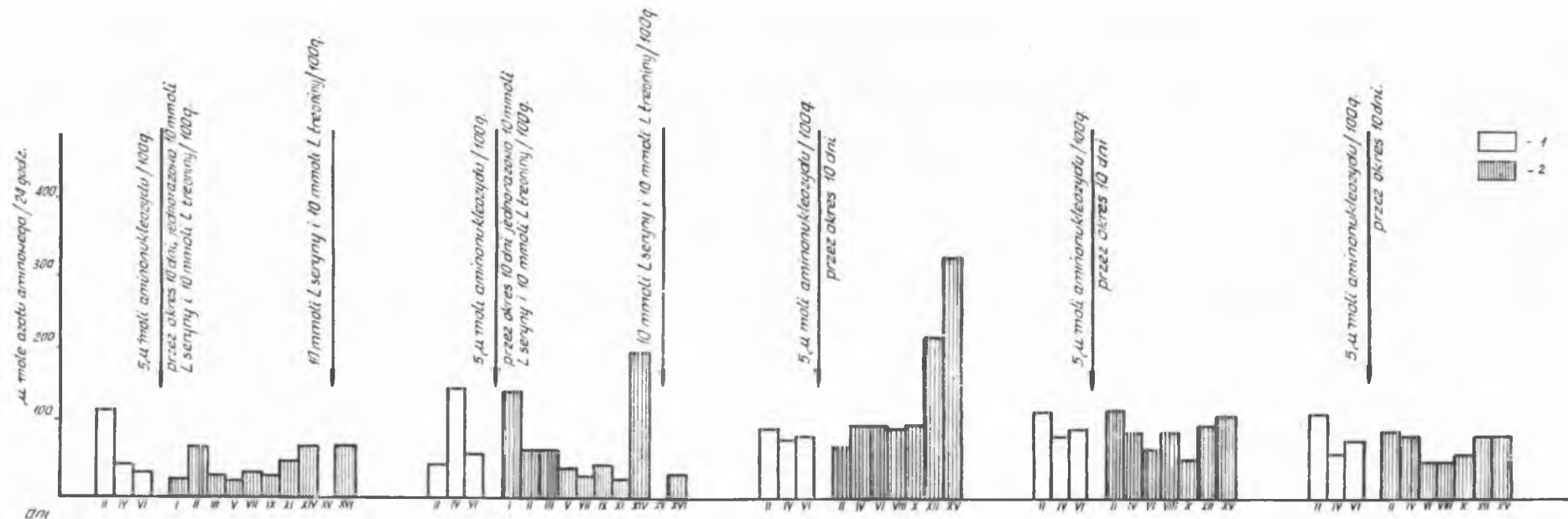
kwasów. Oprócz takich aminokwasów jak: alanina, glutamina, glicyna, kwas glutaminowy, seryna, treonina, tauryna i zasadowych wydalanych w moczu przed zatruciem wykrywa się na chromatogramach: izoleucynę, fenyloalaninę, walinę, metioninę, kwas β -aminoizomasłowy, α -aminomasłowy, prolinę, kwas asparaginowy, cystynę i hydroksyprolinę. Na uwagę zasługuje największa intensywność plam na chromatogramach kwasu glutaminowego i alaniny w porównaniu z innymi aminokwasami.

Nerczyca doświadczalna wywołana aminonukleozydem

Badania przeprowadzono na 5 dorosłych szczurach białych. Podobnie jak w poprzedniej grupie zwierząt badania moczu obejmowały 2 okresy: pierwszy przed podaniem, a drugi po podaniu aminonukleozydu. Aminonukleozyd w dawce $5 \mu\text{M}$, tj. $1,5 \text{ mg}/100 \text{ g}$ wagi wstrzykiwano codziennie podskórnie w izotonicznym chlorku sodu przez okres 10 dni (8).

Ryc. 3 ilustruje wydalanie azotu α -aminowego przed i po zatruciu aminonukleozydem. Zatrucie aminonukleozydem różni się od zatrucia sublimatem. Ilość wydalanego azotu α -aminowego u 3 szczurów nie zwiększa się ani w okresie podawania aminonukleozydu, ani po wywołaniu zespołu nerczycowego, mimo że u wszystkich szczurów od 6 dnia począwszy wzrastają ilości białka w moczu. Nie zmienia się także diureza. Również obraz chromatograficzny aminokwasów moczu nie wykazuje widocznych różnic w porównaniu z obrazem przed podaniem aminonukleozydu. U pozostałych szczurów po okresie 10-dniowym występuje hiperaminoaciduria wyrażająca się wzrostem wydalanego azotu α -aminowego, nasileniem intensywności plam aminokwasów wykrywanych w moczu przed zatruciem, występowaniem na chromatogramach: izoleucyny, waliny i proliny. W tej grupie zwierząt obserwowano także wzrost diurezy.

W nerczycach lipidowych u dzieci w stadiach największego nasilenia choroby, w naszych warunkach doświadczalnych, nie wykrywano w moczu seryny i treoniny. W związku z tymi obserwacjami dwa szczury zatrutowe aminonukleozydem otrzymywały w izotonicznym roztworze chlorku sodu L-serynę i L-treoninę dootrzewnowo w dawce $10 \mu\text{M}/100 \text{ g}$ (9) w pierwszym i piętnastym dniu doświadczenia. Największą intensywność plam seryny i treoniny na elektrochromatogramach stwierdzono w pierwszym dniu po podaniu. Nie wykazano natomiast zwiększonej intensywności plam tych hydroksyaminokwasów już po wywołaniu zespołu nerczycowego. Wyniki oznaczeń diurezy, azotu aminowego, składu aminokwasowego moczu u pięciu kontrolnych szczurów wahają się w tych samych granicach, które stwierdzono u zwierząt przed zatruciem.



Ryc. 3. Wpływ aminonukleozydu na wydalanie azotu aminowego w moczu pięciu szczurów; 1 — azot aminowy w moczu szczurów przed zatruciem aminonukleozydem, 2 — azot aminowy w moczu szczurów w czasie podawania i po zatruciu aminonukleozydem

The effect of aminonucleoside on the excretion of amino nitrogen in the urine of 5 rats; 1 — aminonitrogen in the urine of rats before poisoning with aminonucleoside, 2 — aminonitrogen in the urine of rats during the administration of and after poisoning with aminonucleoside

DYSKUSJA

Obecne badania nad aminoacidurią u szczurów w nerczyco doświadczalnej wywołanej chlorkiem rtęciowym potwierdzają panujący ogólnie pogląd, że hiperaminoaciduria i diureza występujące w zatruciach związkami rtęci są wynikiem uszkodzenia komórek kanalików nerkowych. Jak wiadomo z pracy *Stave* (18) najwięcej rtęci gromadzi się w proksymalnych częściach kanalików nerkowych, gdzie odbywa się reabsorpcja aminokwasów.

Nasuwa się pytanie jaka jest przyczyna wydalania w największej ilości kwasu glutaminowego i alaniny. Można by przypuszczać, że rtęć dzięki dużej reaktywności wiąże grupy $-SH$ kwasu lipoinowego, który pełni centralną rolę w oksydacyjnych dekarboksylacjach. W wyniku tego może dochodzić do nagromadzenia ketokwasów, z których na drodze transaminacji powstaje kwas glutaminowy i alanina. Przypuszczenia te mogą wydawać się tym bardziej słuszne, że nie wykazano hamowania przez diuretyki rtęciowe transaminazy glutaminowo-szczawio-octowej. Stwierdzono natomiast hamowanie dehydrogenazy kwasu α -ketoglutarowego przez preparaty rtęciowe (13). Być może, że w przypadku zatrucia rtęcią dochodzi z jednej strony do syntezy endogennych aminokwasów drogą transaminacji, z drugiej strony do zmniejszenia reabsorpcji aminokwasów w wyniku uszkodzenia kanalików nerkowych.

Obraz zatrucia aminonukleozydem jest odmienny od zatrucia rtęcią. Mechanizm działania aminonukleozydu nie jest dotychczas wyjaśniony. Wiadomo natomiast, że aminonukleozyd wywołuje zespół nerczycowy u szczurów, zbliżony objawami klinicznymi do zespołu nerczycowego u dzieci. Z naszych badań nad aminoacidurią w nerczyco doświadczalnej wywołanej aminonukleozydem wynika, że zmiany w składzie aminokwasowym moczu są niejednakowe dla poszczególnych szczurów. Mimo obecności białka w moczu u wszystkich szczurów tylko u pewnej części zwierząt stwierdzono hiperaminoacidurię. W jednym tylko przypadku śmiertelnego zatrucia aminonukleozydem w dniu poprzedzającym śmierć wystąpiła prolina.

Należy przypomnieć wyniki naszych badań (14) i *Wolfa* (19), że w ostrych fazach przebiegu choroby u dzieci z nerczyką lipidową zakończoną zwykle śmiercią wykrywano w moczu obok waliny, metioniny, leucyny, izoleucyny, fenyloalaniny, — prolinę. Otrzymane wyniki sugerują, że w pierwszym okresie zatrucia aminonukleozyd powoduje zwiększenie przepuszczalności kłębka, którego wyrazem jest białkomocz. W czasie drugiej fazy choroby zostają uszkodzone kanaliki nerkowe, co manifestuje się hiperaminoacidurią. Okres od zatrucia kłębuszka do uszkodzenia kanalików wiąże się prawdopodobnie z indywidualnością zwierzęcia.

W badaniach własnych posługiwano się doświadczalnymi nerczycami wywołanymi u zwierząt. Trudno byłoby uzyskane wyniki bezkrytycznie porównywać z wynikami otrzymanymi u ludzi. Jednakże wydaje się, że w nerczycy lipidowej u dzieci i w zespole nerczycowym u szczurów wywołanym aminonukleozydem dochodzi w pierwszym stadium choroby do uszkodzenia kłębka. Uszkodzenie kanalika jest procesem wtórnym. Wydaje się, że trudności w wyprowadzaniu ogólnych wniosków na temat aminoacidurii w nerczycach u dzieci można wytłumaczyć tym, że badania przeprowadza się w różnych stadiach nasilenia choroby.

PISMIENNICTWO

1. Angielski S., Rogulski J., Madońska L.: *Acta Biochim. Polon.*, **7**, 269—284, 1960.
 2. Barlett P., Shelate S.: *Proc. Soc. Biol. and Med.* **102**, 499—506, 1959.
 3. Barlett P., Keegan J., Schaefer H.: *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, **112**, 96—101, 1963.
 4. Barlett P.: *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, **108**, 611—615, 1961.
 5. Baxter J. H., Goodman H. C.: *J. Exper. Med.* **104**, 467—473, 1956.
 6. Fischl J., Segal S.: *Clin. Chim. Acta*, **8**, 479—484, 1963.
 7. Fischl J., Segal S.: *Clin. Chim. Acta*, **8**, 399—405, 1963.
 8. Frenk S., Antonowicz I., Graig J. M., Metcuff J.: *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, **89**, 424—427, 1955.
 9. Hernandez T., Coulsen R. A.: *Biochem. J.*, **79**, 596—605, 1961.
 10. Heymann W., Hackel D. B., Horwood S., Wilson S. G., Hunter J.: *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, **100**, 660—664, 1959.
 11. Hoofft C., Herpel J.: *Acta Paediatrica*, **48**, 135—148, 1959.
 12. Łazarewa N. W.: *Wywoływanie chorób u zwierząt dla badań doświadczalno-leczniczych*, 1957.
 13. Mustakallio K. K., Pitkanen E., Nikkila E. A.: *Ann. Med. Exp. Fenn.* **38**, 186—203, 1960.
 14. Opieńska-Blauth J., Kowalska H.: *Clin. Chim. Acta*, **6**, 805—813, 1961.
 15. Schreider K., Sattelberg H. G.: *Klin. Wochenschr.*, **29**, 672—673, 1951.
 16. Slater R., Kretschmer N., MacNamara H., Barnett H. L.: *Amer. J. Dis. Child.*, **90**, 611, 1955.
 17. Spier H. W., Pascher G.: *Z. Physiol. Chem.*, **296**, 147—154, 1954.
 18. Stave U.: *Klin. Wochenschr.*, **35**, 860—866, 1957.
 19. Woolf L. I., Mc C. Giles H.: *Acta Paediat.*, **45**, 489—500, 1956.
- Pracę otrzymano 15 XI 1965.

Исследования аминокислотурии крыс при экспериментальном нефрозе, вызванном аминокислотозидом (пурамицином) и хлоридом ртути

Резюме

Проведены сравнительные исследования аминокислотурии крыс с физиологических условиях после интоксикации хлоридом ртути и аминокислотозидом.

Констатировано, что при аминоацидурии, вызванной хлоридом ртути, на второй день после интоксикации появились у всех крыс особенно усиленная гипераминоацидурия, диурез и значительная протеинурия.

При нефрозе, вызванным аминонуклеозидом, только у некоторой части животных констатированы небольшая гипераминоацидурия, диурез и протеинурия.

Полученные результаты имеют большое сходство с аминоацидурией в нефрозе у детей.

Рис. 1. Влияние хлорида ртути на удаление аминокислотного азота в моче трёх крыс: 1 — аминокислотный азот в моче крыс перед интоксикацией хлоридом ртути, 2 — аминокислотный азот в моче крыс после интоксикации хлоридом ртути.

Рис. 2. Влияние хлорида ртути на удаление аминокислотного азота в моче двух крыс (измерения проводились через день): 1 — аминокислотный азот в моче крыс перед интоксикацией хлоридом ртути, 2 — аминокислотный азот в моче крыс после интоксикации хлоридом ртути.

Рис. 3. Влияние аминонуклеозида на удаление аминокислотного азота в моче пяти крыс: 1 — аминокислотный азот в моче крыс перед поданием аминонуклеозида, 2 — аминокислотный азот в моче крыс во время подания аминонуклеозида и после интоксикации.

Investigations on Aminoaciduria in Rats with Experimentally Induced Nephrosis by Aminonucleoside (Puromycin) and Mercuric Chloride

Summary

Comparative investigations were performed on aminoaciduria in rats, kept under normal conditions and treated with mercuric chloride and aminonucleoside.

On the second day, as a result of experimentally induced aminoaciduria, severe hyperaminoaciduria, diuresis and considerable albuminuria were observed with all experimental animals.

In the nephrotic syndrome caused by aminonucleoside, a slight hyperaminoaciduria, diuresis and albuminuria were observed to occur with a certain percent of animals. The results obtained show considerable similarity to the aminoaciduria picture observed in the nephrosis of children.

