

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Wydział Lekarski,  
Akademia Medyczna w Lublinie  
Kierownik: prof. dr med. Stanisław Grzycki

Irena KRÓLIKOWSKA-PRASAŁ

**Ocena zmian w składzie aminokwasów w tkance wątrobowej  
metodą elektrochromatografii skrawkowej**

An Estimation of the Changes in the Amino Acid Composition of Liver  
Tissues by Paper Electrochromatography

Metoda chromatografii do badania skrawków tkankowych była opisana przez Lindnera (8), zastosowana do badań aminokwasów przez George i wsp. (4), Ackermann i Sarnecką-Keller (1) oraz Staszycza (12). Określanie składu aminokwasów w skrawkach tkankowych metodami histochemicznymi (reakcja ninhydrynowa, Millona) jest ograniczone i wiele odczynów swoistych jest nieprzydatnych (2, 11). Wprowadzenie metody chromatografii skrawkowej w tych przypadkach wydaje się być celowe.

W naszych badaniach nad stanem aminokwasowym wątroby samców kastrowanych obustronnie i poddanych działaniu metylolestosteronu, zastosowano elektrochromatografię bibułową skrawków.

**MATERIAŁ I METODYKA BADAŃ**

Badania przeprowadzono na samcach szczurów białych (40 szt.) hodowli własnej, 7—8 miesięcznych, wagi około 200—250 g., które przebywały w jednakowych warunkach i żywione były tą samą dietą. 20 zwierząt operowano pod narkozą eterową wycinając jądra z najądrzem, jednocześnie podwiązując naczynia i nasieniowody. Wszystkie zwierzęta podzielono na 4 grupy: I — zwierzęta kastrowane (grupa Ia, Ib), II — zwierzęta kastrowane, którym podawano metylolestosteron począwszy od 3 dnia po zabiegu w ilości 5 mg na zwierzę 2 razy w tygodniu (grupa IIa, IIb). III — zwierzęta nie kastrowane (grupy IIIa i IIIb), którym podawano podskórnie metylolestosteron w ten sam sposób i w tej samej ilości jak w grupie II oraz IV — zwierzęta kontrolne. W każdej grupie zwierzęta były uśmiercane przez dekapitację po a) 2 tygodniach i b) 3 miesiącach od rozpoczęcia badań. Pobierano wycinki z prawego płata wątroby zawsze o tej samej porze, tj. o 9 godz. Wycinki natychmiast zamrażano i krajano na mikrotomie mroźnym na skrawki 50  $\mu$  grubości.

Do analizy składu aminokwasowego zastosowano elektrochromatografię wg metody Fischla i Segala (3), która pozwala na przeprowadzenie procesu elektroforezy i chromatografii na jednym arkuszu bibuły. W tym celu skrawki umieszczono na bibule chromatograficznej Whatman 4 w lewym dolnym brzegu. Po uprzednim nasyceniu bibuły buforem (o składzie 7,8% kwasu octowego i 2,5% kwasu mrówkowego w stosunku 1:1 (obj./obj.) i o pH 2,2 umieszczano ją w komorze elektroforetycznej z tym samym buforem. Napięcie przepływającego prądu wynosiło 700 V, natężenie 11 mA, czas elektroforezy 1 godz. Po elektroforezie przeprowadzono dwukrotną chromatografię wstępującą w czasie 12 godz. Jako układ rozwijający stosowano n-butanol, kwas octowy, woda w stosunku 4:1:1 (obj./obj.). Elektrochromatogramy wywoływano w acetonowym roztworze 0,5% ninhydryny i suszono w temp. 60°C. Jednocześnie w tych samych warunkach przeprowadzono elektrochromatografię hydrolizatu białkowego (globulina). Próbkę białka ogrzewano w temp. 105°C w 12 N HCl w zatopionej ampułce szklanej przez 17 godz. Po przeprowadzeniu wstępnych prób można było z każdej grupy zwierząt uzyskać przynajmniej 4 elektrochromatogramy posiadające prawie analogiczny obraz aminokwasów.

#### BADANIA WŁASNE

Uzyskane elektrochromatogramy aminokwasów ze skrawków wątrobowych poszczególnych grup doświadczalnych oraz grupy kontrolnej były identyfikowane z elektrochromatogramem hydrolizatu białkowego (ryc. 1). Elektrochromatogram kontrolny (ryc. 2) jest zbliżony pod względem ilości i rozmieszczenia plam ninhydrynopozytywnych do elektrochromatogramu hydrolizatu białkowego. Udało się wyróżnić 3 grupy aminokwasów: 1) aminokwasy o charakterze kwaśnym (dolna lewa część); w tej grupie występują również w zmniejszonej ilości aminokwasy obojętne, 2) aminokwasy o charakterze obojętnym (lewa górna część) i 3) aminokwasy zasadowe (prawa dolna część). We wszystkich badanych skrawkach zwierząt nie występują zmiany w układzie aminokwasów grupy I (dolna lewa część) (ryc. 2—8), natomiast kształty plam w porównaniu z elektrochromatogramem wzorcowym (ryc. 1) są rozmyte i wydłużone. Skrawki pobrane z grupy Ia i analizowane stosowaną metodą (ryc. 3) wykazały różnice w porównaniu z kontrolnym elektrochromatogramem, polegające na zróżnicowaniu grupy zasadowej aminokwasów i pojawieniu się dodatkowej plamy. W porównaniu do grupy Ia skrawki zwierząt grupy Ib (ryc. 4) na elektrochromatogramie wykazują pojawienie się trzech dodatkowych plam, odpowiadających prawdopodobnie polipeptydom oraz czterech mniejszych plamek w grupie aminokwasów obojętnych, które — przypuszcza się — stanowią lepsze zróżnicowanie 4 aminokwasów występujących na elektrochromatogramie kontrolnym. Grupa IIa (ryc. 5) zawiera o jedną plamę ninhydrynopozytywną z grupy aminokwasów zasadowych mniej i 3 plamy analogicznie, jak w grupie Ib. Grupa IIb (ryc. 6) wykazuje podobny obraz,

jak kontrola. Elektrochromatogram grupy IIIa (ryc. 7), odzwierciedlający zmiany aminokwasów w skrawkach wątrobowych zwierząt, którym podawano metylotestosteron, nie wykazuje zasadniczych różnic z elektrochromatogramem kontrolnym (ryc. 2) za wyjątkiem plam z grupy aminokwasów zasadowych (o jedną mniej). Grupa IIIb (ryc. 8) w porównaniu do kontrolnej zawiera 3 dodatkowe plamy ninhydrynopozytywne.

#### OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ

Określanie poszczególnych aminokwasów metodami histochemicznymi jest ograniczone małą ilością swoistych odczynów. Aminokwasy inaczej reagują w zdenaturowanych białkach skrawków tkankowych niż w hydrolizatach rodzimych (11). Zastosowanie metody elektrochromatografii (9, 10), tj. połączenia elektroforezy z chromatografią, pozwala uzyskać bardziej pewne wyniki w określaniu zmian w poszczególnych grupach aminokwasów w skrawkach niż stosowanie samej chromatografii. W naszych badaniach aminokwasy są rozdzielane drogą elektroforezy w jednym kierunku, a chromatografia przeprowadzona w przeciwnym kierunku zwiększa selektywność rozdzielenia substancji na płaszczyźnie (5, 7). Zastosowana przez nas elektrochromatografia skrawkowa pozwoliła wykazać różnice w jakości poszczególnych aminokwasów w grupach doświadczalnych i porównać je z grupą zwierząt kontrolnych.

Na podstawie uzyskanych elektrochromatogramów możemy stwierdzić, że w skrawkach wątroby zwierząt kastrowanych daje się zauważyć wzrost ilości aminokwasów zasadowych, zwłaszcza w krótkim okresie czasu po gonadektomii oraz pojawienie się bliżej nie zidentyfikowanych związków ninhydrynopozytywnych, prawdopodobnie polipeptydów. W skrawkach wątroby zwierząt kastrowanych po podaniu metylotestosteronu obserwowano pojawienie się analogicznych ninhydrynopozytywnych związków tylko w tej grupie zwierząt, którym przez krótki okres czasu (2 tygodnie) podawano metylotestosteron, natomiast nie zauważono ich u zwierząt, którym podawano przez okres 3 miesięcy. Na elektrochromatogramach ze skrawków wątroby zwierząt nie kastrowanych, którym podawano metylotestosteron przez krótki okres czasu, nie obserwowano żadnych zmian w stosunku do kontroli. Dalsze podawanie zwierzętom metylotestosteronu wpływało na zmniejszanie ilości aminokwasów obojętnych. Przypuszcza się, że zmiany w składzie aminokwasowym wątroby, obserwowane w grupach doświadczalnych, a zwłaszcza u zwierząt kastrowanych, związane są z syntezą i rozpadem białek, co jest zgodne z danymi Williamsa (14).

Występowanie rozmytych i wydłużonych plam na elektrochromatogramach skrawkowych należy tłumaczyć silną adsorpcją rozdzielania

składników na bibule i wolno ustalającą się równowagą współczynnika podziału rozdzielanych składników między fazą stałą a ciekłą (13). Również uważa się, że sukcesywne uwalnianie się tego samego składnika (np. kwasu glutaminowego) ze skrawka w warunkach elektroforezy może powodować smugi tworzącej się plamy aminokwasu.

Na elektrochromatogramach wyróżniono tylko 3 grupy aminokwasów, ponieważ dokładna identyfikacja poszczególnych plam jest utrudniona z uwagi na konieczność posiadania pełnej mapki aminokwasów i peptydów oraz na możliwość tworzenia kompleksowych połączeń podczas uwalniania składników komórkowych ze skrawka.

### Wnioski

1. Do określenia składu aminokwasowego tkanki wątrobowej w warunkach doświadczalnych zastosowano po raz pierwszy metodę elektrochromatografii skrawkowej.

2. Stwierdzono, że w skrawkach wątrobowych wszystkich trzech grup doświadczalnych nie występują zmiany w grupie aminokwasów kwaśnych i obojętnych.

3. U zwierząt kastrowanych zaobserwowano wyraźne zmiany w grupie aminokwasów zasadowych i wystąpienie dodatkowych plam ninhydrinopozytywnych (prawdopodobnie polipeptydy), natomiast mniej wyraźne w pozostałych grupach.

### PIŚMIENNICTWO

1. Ackermann J., M. Sarnecka-Keller: *Histochemie* 3, 89—96, 1962.
2. Barka T., P. J. Anderson: *Histochemistry Theory, Practice and Bibliography*, Hoeber Medical Division. Harper & Row, Publisher, Inc. New York, Evanston and London 1965.
3. Fischl J., D. Segal: *Clin. Chim. Acta* 8, 479—485, 1963.
4. George J. C., S. D. Pishiwikar, K. S. Scarpia: *Exptl. Cell Res.* 15, 242—244, 1958.
5. Hangaard G., T. D. Kromer: *J. Am. Chem. Soc.* 70, 2135—2140, 1948.
6. Hartmann F., H. J. Muller: *Naturwiss.* 39, 283—287, 1952.
7. Kickhofen B., Q. Westphal: *Z. Naturforsch.* 76, 659—664, 1952.
8. Lindner J.: *Naturwiss.* 43, 201—208, 1956.
9. Opieńska-Blauth J.: *Post. Biochem.* 13, 595—611, 1967.
10. Opieńska-Blauth J., A. Waksmundzki, M. Kański: *Chromatografia*, PWN, Warszawa 1957.
11. Pearse A. G. E.: *Histochemia teoretyczna i stosowana*, PZWL, Warszawa 1957.
12. Staszyc J.: *Ann. Univ. Mariae Curie Skłodowska, Lublin. Sec. D.* 21, 61—78, 1966.

13. Trueblood K. N., E. W. Malborg; J. Am. Chem. Soc. **72**, 4112, 1950.  
14. Williams R. H.: Endokrynologia, PZWL, Warszawa 1964.  
Pracę otrzymano 20 XII 1966.

#### OBJAŚNIENIA DO TABLIC

Ryc. 1. Elektrochromatogram hydrolizatu białkowego. Elektroforeza: bufor o pH 2,2 (7,8% kwas octowy i 2,5% kwas mrówkowy w stosunku 1:1). Napięcie prądu 700 V, natężenie 11 mA, czas 1 godz. Plamy wywoływano 0,5% acetonowym roztworem ninhydryny. Warunki powyższe dotyczą pozostałych elektrochromatogramów.

Ryc. 2. Elektrochromatogram skrawków wątroby szczurów z grupy kontrolnej.

Ryc. 3. Elektrochromatogram skrawków wątroby szczurów w 2 tygodnie po gonadektomii.

Ryc. 4. Elektrochromatogram skrawków wątroby szczurów w 3 miesiące po gonadektomii.

Ryc. 5. Elektrochromatogram skrawków wątroby szczurów, którym od 3 dnia po gonadektomii podawano metylolestosteron przez okres 2 tygodni w ilości 5 mg 2 razy tygodniowo.

Ryc. 6. Elektrochromatogram skrawków wątroby szczurów, którym od 3 dnia po gonadektomii podawano metylolestosteron przez okres 3 miesięcy w ilości 5 mg 2 razy tygodniowo.

Ryc. 7. Elektrochromatogram skrawków wątroby szczurów nie kastrowanych, którym podawano metylolestosteron przez 2 tygodnie w ilości 5 mg 2 razy tygodniowo.

Ryc. 8. Elektrochromatogram skrawków wątroby szczurów nie kastrowanych, którym podawano metylolestosteron przez okres 3 miesięcy w ilości 5 mg 2 razy tygodniowo.

#### **Применение метода электрохроматографии на бумаге при оценке изменений в аминокислотах, происходящих в печеночных срезах**

##### Резюме

Пользуясь методом электрохроматографии срезов, наблюдался аминокислотный состав печеночной ткани у кастрированных крыс, а также у кастрированных и некастрированных крыс, которым два раза в неделю в течение двух недель и трёх месяцев впрыскивалось 0,5 мг метилтестостерона.

При сравнении электрохроматограмм отдельных групп с образцовой электрохроматограммой обнаружилось изменения в составе аминокислот в группе кастрированных животных.

#### **An Estimation of the Changes in the Amino Acid Composition of Liver Tissues by Paper Electrochromatography**

##### Summary

Paper electrochromatography was used to estimate the changes in the amino acid composition of the liver tissue of castrated and nonca-

strated white rats which were given 5 mg. of methyltestosterone twice a week, for periods of two weeks and 3 months.

The comparison of the electrochromatograms of particular groups with the pattern electrochromatogram showed some changes in the amino acid composition of the castrated rats.

#### EXPLANATION TO FIGURES

Fig. 1. Electrochromatogram of the protein hydrolysate. Electrophoresis was performed for 1 hr. in buffer, pH 2.2 (7.8% acetic acid and 2.5% formic acid in proportion 1:1 v/v) with a tension of 700 V and a current of 11 mA. The spots were located with 0.5% acetone solution of ninhydrin. The above conditions also refer to electrochromatograms presented in Figs. 2—8.

Fig. 2. Electrochromatogram of the liver sections of rats from the control group.

Fig. 3. Electrochromatogram of the liver sections of rats, two weeks after gonadectomy.

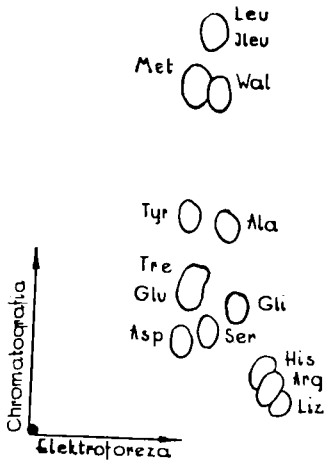
Fig. 4. Electrochromatogram of the liver sections of rats, three months after gonadectomy.

Fig. 5. Electrochromatogram of the liver sections of rats which on the third day after gonadectomy were given 5 mg. of methyltestosterone twice a week for a fortnight.

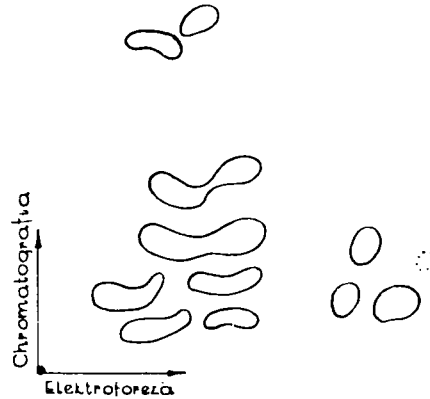
Fig. 6. Electrochromatogram of the liver sections of rats which on the third day after gonadectomy were given 5 mg. of methyltestosterone twice a week for 3 months.

Fig. 7. Electrochromatogram of the liver sections of noncastrated rats which were given 5 mg. of methyltestosterone twice a week for a fortnight.

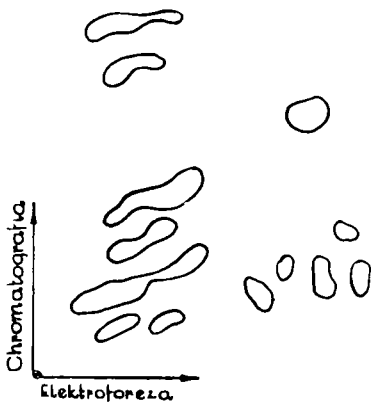
Fig. 8. Electrochromatogram of the liver sections of noncastrated rats which were given 5 mg. of methyltestosterone twice a week for 3 months.



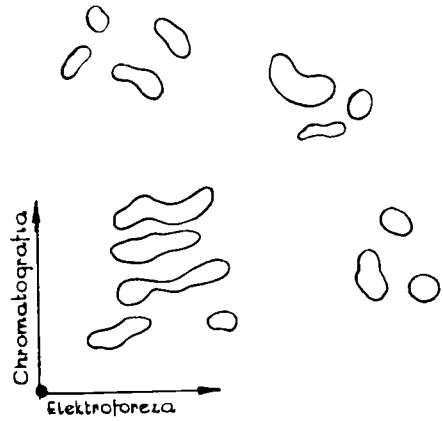
ryc. 1



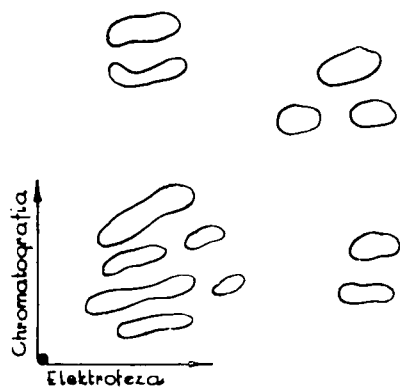
ryc. 2



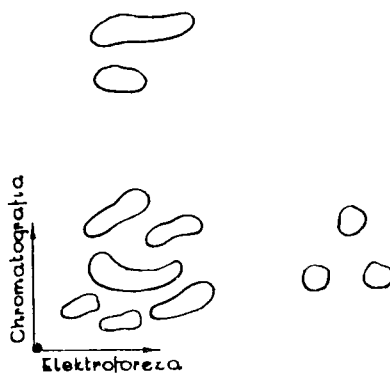
ryc. 3



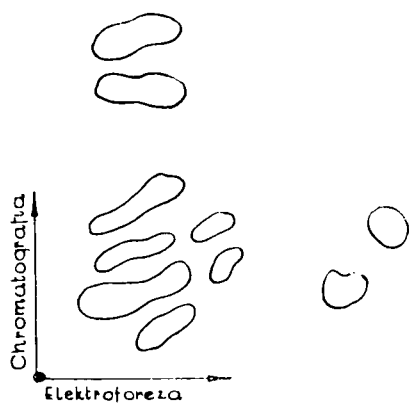
ryc. 4



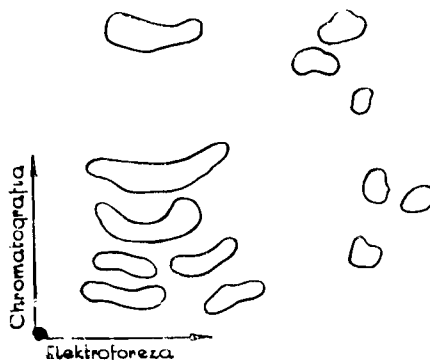
ryc. 5



ryc. 6



ryc. 7



ryc. 8