

Katedra i Zakład Chemii Ogólnej. Wydział Lekarski. Akademia Medyczna w Lublinie
Kierownik: doc. dr Irena Krzeczowska

Zbigniew CZERNIAK

**Aminokwasy wolne, N-podstawione i peptydowe w moczu ludzi
z przewlekłą niewydolnością nerek**

Свободные, N-замещенные и пептидовые аминокислоты в моче людей
с хронической недостаточностью почек

Free, N-substituted and Peptide Amino Acids in Urine of Patients with Chronic
Renal Insufficiency

Niewydolności nerek towarzyszą złożone zaburzenia metaboliczne, niedostatecznie dotychczas wyjaśnione. W badaniach nad metabolizmem związków azotowych w mocznicach zajmowano się także aminokwasami, oznaczając ich poziomy we krwi ludzi chorych (1, 8, 11), natomiast mało uwagi poświęcano aminoacyduri. Badanie wydalania wolnych aminokwasów z moczem może pomóc w ustaleniu zaburzeń filtracji kłębkowej i wchłaniania zwrotnego.

Dla wyjaśnienia niektórych patomechanizmów mocznicznych ważne jest także zbadanie wydalania aminokwasów związanych, a szczególnie N-podstawionych. Z wcześniejszych doniesień wiadomo bowiem, że w przebiegu mocznicznych znacznie wzrasta stężenie N-podstawionych aminokwasów we krwi (9). Dotychczas brak doniesień dotyczących wydalania peptydów przez chorych z mocznicą. Badania aminokwasów związanych w moczu przeprowadzano oznaczając łącznie aminokwasy N-podstawione i peptydowe (23), bądź też badano jedynie peptydy (13). Oddzielne oznaczanie N-podstawionych i peptydowych aminokwasów natrafiało dotychczas na trudności ze względu na brak odpowiedniej, dokładnej, a zarazem prostej metody. Przeprowadzenie obecnych badań było możliwe dzięki zastosowaniu metody własnej opisaną poprzednio (4, 6).

Celem naszej pracy było oznaczenie wydalania aminokwasów N-podstawionych oraz peptydowych i wolnych w moczu ludzi z przewlekłą niewydolnością nerek. Specjalnie zwrócono uwagę na aminokwasy N-podstawione, jako najmniej zbadane, i ograniczono oznaczenia ilościowe aminokwasów wolnych i peptydowych do związków stwierdzonych poprzednio w formie zablokowaną grupą aminową (aminokwasy N-podstawione).

MATERIAŁ I METODY

Do badań pobierano 10 ml próbki z dobowego moczu 20 chorych z przewlekłą niewydolnością nerek, przebywających na leczeniu w II Klinice Chorób Wewnętrznych AM w Lublinie. Wiek chorych wahał się od 19 do 66 lat. W badanej grupie

było 10 kobiet i 10 mężczyzn. W większości przypadków (13 chorych) pierwotną przyczynę mocznicy stanowiło zapalenie kłębków nerkowych. U 6 chorych niewydolność nerek rozwinęła się w wyniku zapalenia odmiedniczkowego nerek, a w jednym przypadku mocznica wystąpiła przy współistniejącej torbielowatości nerek. U wszystkich chorych stwierdzano mniejszego lub większego stopnia niedokrwistość i nadciśnienie.

W uzależnieniu od ciężkości schorzenia, kierując się wysokością poziomu mocznika we krwi, chorych podzielono na dwie grupy po 10 osób. W grupie pierwszej znaleźli się chorzy z poziomem mocznika we krwi od 45 mg% do 150 mg%, a w drugiej z mocznikiem powyżej 150 mg%. Grupę kontrolną stanowiło 10 zdrowych osobników w wieku od 21 do 65 lat, w tym 5 kobiet i 5 mężczyzn.

Aminokwasy związane oznaczano po odpowiednim przygotowaniu materiału. Stosowano elektroforezę cienkowarstwową (6), metodę własną pozwalającą na oddzielenie peptydów od aminokwasów wolnych (4), hydrolizę kwaśną oraz chromatografię bibułową i zmodyfikowaną fotometrię negatywów chromatogramów (3). Przy analizie aminokwasów wolnych wykorzystano chromatografię bibułową oraz zmodyfikowaną metodę fotometrii negatywów chromatogramów.

Otrzymane wyniki poddano analizie statystycznej. Obliczenia wykonano na maszynie numerycznej „Odra 1013” w Zakładzie Metod Numerycznych Katedry Analizy Matematycznej UMCS.

BADANIA WŁASNE

Przygotowanie moczu

10 ml próbki moczu odparowywano pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze 25°C do objętości około 4 ml i odbiałczano, podobnie jak Geer i wsp. (10), dodając 20 ml 95% etanolu. Strącony osad odwirowywano, a pozostały roztwór zagęszczano ponownie do 4 ml i dodawano do niego 10 ml 95% etanolu. Po odwirowaniu roztwór odparowywano (w warunkach wyżej podanych) i rozpuszczano w 5 ml wody redestylowanej. Po zakonserwowaniu tymolem roztwory służyły do dalszych badań. W niniejszej pracy nie stosowano specjalnych metod odsalania moczu ze względu na zachodzenie tego procesu w czasie przeprowadzanej w badaniach elektroforezy.

Aminokwasy N-podstawione

Przygotowany materiał rozdzielano na drodze elektroforezy cienkowarstwowej na żelu krzemionkowym, stosując bufor o pH 2,0, napięcie 250 V i natężenie 8,4 mA. Czas elektroforezy wynosił 1 godzinę. Po zakończeniu rozdzielania, aminokwasy N-podstawione znajdowały się po stronie anody w strefie ninhydrynonegatywnej elektroferogramu. Następnie zdejmowano żel w strefie zawierającej połączenia ninhydrynonegatywne i po unieczynnieniu, za pomocą wody utlenionej, zawartej w nim ninhydryny, hydrolizowano go stosując 6 n HCl. Hydrolizaty poddawano następnie analizie chromatograficznej — chromatografii bibułowej krążkowej i wstępującej jednokierunkowej (7, 15). Do oznaczeń ilościowych zastosowano metodę fotometrii negatywów chromatogramów, opierającą się na pomiarze natężenia światła przechodzącego przez negatyw chromatogramu (14) z modyfikacją (3). Dokładny opis przytoczonego powyżej postępowania zamieszczono w innej pracy (6).

Aminokwasy peptydowe

Po zakończeniu opisanego poprzednio rozdziału elektroforetycznego, peptydy znajdowały się razem z aminokwasami wolnymi, po stronie katody, w strefie ninhydrynopozytywnej elektroferogramu. Do oddzielenia peptydów od aminokwasów wolnych wykorzystano reakcję ninhydrynową (17, 18) stosując obecnie odmienną, podaną niżej metodykę.

Na wywołanym ninhydryną elektroferogramie zakresłano strefę ninhydrynopozytywną obejmującą wszystkie plamy. Z zakreszonego obszaru zdejmowano żel i dodawano do niego 5 ml 0,3% etanolowego roztworu ninhydryny. Próbę sprowadzano przy pomocy buforu cytrynianowego do pH 5,0 i ogrzewano, w temperaturze wrzenia, aż do całkowitego odparowania, po czym dodawano od niej 2 ml 3% wody utlenionej w celu rozłożenia nadmiaru ninhydryny i powstałego barwnika. Tego rodzaju działanie wody utlenionej wykazał Guzzi i wsp. (12). Próbę ogrzewano przez 2 min. w temperaturze 100°C i odparowywano w temperaturze 25°C. Powyższy proces powtarzano trzykrotnie. Żel z zablokowanymi wolnymi aminokwasami poddawano hydrolizie 6n HCl w temperaturze 105°C. Optymalny czas trwania hydrolizy wynosił 16 godzin. Hydrolizaty po usunięciu kwasu solnego analizowano jak przy badaniu aminokwasów N-podstawionych. Przedstawione powyżej postępowanie pozwala na oznaczenie składu aminokwasowego peptydów z wykluczeniem aminokwasów końcowych, które ulegają zniszczeniu, biorąc udział w reakcji z ninhydryną. W poprzedniej pracy podano bardziej dokładny opis powyższej metody (4).

Aminokwasy wolne

Mocz do badań przygotowywano podobnie jak przy oznaczaniu aminokwasów związanych. Analizę jakościową przeprowadzano przy użyciu metody chromatografii bibułowej stosując technikę krawkową wg Przybylskiej i wsp. (19) oraz Williamsa i Kirby (26). W przypadku aminokwasów trudno rozdzielających się zastosowano dodatkowo rechromatografię oraz reakcje specyficzne. Dokładne opisy postępowania zostały zamieszczone w poprzednich pracach (7, 15).

Oznaczenia ilościowe, zarówno wolnych jak i związanych aminokwasów, wykonywano zmodyfikowaną metodą fotometrii negatywów chromatogramów (3). Otrzymane wyniki opracowywano statystycznie na drodze analizy wariancji dla klasyfikacji pojedynczej (22) oraz przedziałów ufności T (25).

OMÓWIENIE WYNIKÓW I WNIOSKI

Aminokwasy N-podstawione

Po przeprowadzeniu analizy moczu ludzi zdrowych stwierdzono obecność następujących aminokwasów, występujących w formie N-podstawionej: lizyny, kwasu asparaginowego, kwasu glutaminowego, glicyny, seryny, treoniny, α -alaniny oraz śladów waliny, proliny i β -alaniny. Aminokwasem wydalanym w moczu w największej ilości jest kwas glutaminowy — 32,3 mg/dobę, a najmniej wydalają ludzie zdrowi N-podstawionej treoniny — 6,4 mg/dobę (pomijając aminokwasy śladowe). Uzyskane wyniki są zbliżone do wyników otrzymanych przez

Tab. 1. Aminokwasy N-podstawione w moczu ludzi zdrowych i chorych w mg/dobę
N-substituted amino acids in urine of normal subjects and patients in mg/day

Aminokwasy	Ludzie zdrowi		Chorzy grupa 1		Chorzy grupa 2		F ^o	F _{0,01}
	średnie stężenie	zakres	średnie stężenie	zakres	średnie stężenie	zakres		
Lizyna	8,30	6,2—11,4	8,00	5,9—12,3	7,50	5,8—9,8	0,43	5,49
Kwas asparaginowy	24,30	18,4—27,8	23,00	16,4—26,8	21,60	16,1—25,1	1,69	5,49
+ Glicyna	18,14	16,1—23,2	17,20	14,4—22,3	21,40	16,3—24,5	8,01	5,49
Seryna	6,80	5,1—8,3	6,23	5,0—7,2	5,70	4,9—7,8	3,17	5,49
Kwas glutaminowy	32,30	27,4—36,4	30,60	26,9—34,3	30,10	27,1—34,6	1,85	5,49
Treonina	6,40	5,4—8,4	5,90	4,8—7,8	5,80	4,7—7,3	1,05	5,49
α-Alanina	10,21	6,4—12,4	11,30	7,4—13,9	9,10	6,6—12,3	2,71	5,49

+ oznaczono różnice statystycznie istotne

+ statistically significant differences were marked

Tab. 2. Aminokwasy peptydowe w moczu ludzi zdrowych i chorych w mg/dobę
Peptide amino acids in urine of normal subjects and patients in mg/day

Aminokwasy	Ludzie zdrowi		Chorzy grupa 1		Chorzy grupa 2		F ^o	F _{0,01}
	średnie stężenie	zakres	średnie stężenie	zakres	średnie stężenie	zakres		
Kwas asparaginowy	7,80	5,3—9,2	7,10	5,6—9,0	6,20	4,7—8,4	4,22	5,49
Seryna	6,40	4,7—8,3	6,00	4,5—7,2	5,20	4,0—7,1	3,38	5,49
Glicyna	28,20	22,3—33,6	27,30	23,2—32,3	26,10	20,1—30,1	1,21	5,49
Kwas glutaminowy	20,00	16,3—27,2	19,10	15,7—24,4	17,80	14,3—21,6	1,40	5,49
+ Treonina	5,80	4,7—7,3	5,10	4,5—6,0	4,80	4,4—6,2	5,63	5,49
α-Alanina	9,30	7,3—12,3	8,40	6,3—11,7	8,10	6,4—10,3	1,59	5,49

+ oznaczono różnice statystycznie istotne

+ statistically significant differences were marked

innych autorów (2, 16, 24), a różnią się znacznie jedynie od rezultatów badań Satwekara i wsp. (21), którzy wykryli tylko glicynę, kwas glutaminowy i α -alaninę. Zachodzące różnice wiążą się prawdopodobnie z odmienną metodyką badań i z różnymi sposobami przygotowywania materiału. Trudno jest jeszcze ustalić budowę połączeń ninhydrynonegatywnych. Można jedynie przypuszczać, że wykryta glicyna wchodzi w skład kwasu hipurowego, a kwas glutaminowy pochodzi z fenyloacetyloglutaminy. Brak natomiast zupełnie danych odnośnie związków, w skład których mogłyby wchodzić inne wykryte obecnie aminokwasy.

Nie stwierdzono różnic jakościowych w składzie aminokwasów N-podstawionych u ludzi zdrowych i chorych z niewydolnością nerek. Po wykonaniu oznaczeń ilościowych przeprowadzono analizę statystyczną, a otrzymane wyniki zamieszczono w tab. 1.

Z tab. 1 wynika, że odnośnie wszystkich aminokwasów z wyjątkiem glicyny, brak jest istotnych różnic między średnimi oznaczeń dla poszczególnych badanych grup ludzi. Jak wykazały 5% przedziały ufności, różnice występują między średnimi dla grupy I i III oraz dla grupy II i III, czyli następuje istotny wzrost wydalania glicyny z moczem u ludzi z poziomem mocznika powyżej 150 mg%. Chorzy ci wydalają z moczem średnio 21,4 mg glicyny na dobę. Natomiast średnie dla grupy I i II nie różnią się między sobą. Ogólnie można stwierdzić, że wydalanie z moczem N-podstawionych aminokwasów jest uzależnione w małym stopniu od ciężkości schorzenia. Wykryte zmiany dotyczą jedynie jednego aminokwasu — N-podstawionej glicyny.

Aminokwasy peptydowe

Analiza chromatograficzna pozwoliła na wykrycie w moczu ludzi zdrowych następujących aminokwasów związanych w peptydach: kwasu asparaginowego, kwasu glutaminowego, glicyny, α -alaniny, treoniny, seryny, argininy, cystyny, waliny, proliny oraz śladów lizyny, histydyny i leucyny. Tak więc w formie peptydowej występują wszystkie aminokwasy wykryte poprzednio w połączeniach z zablokowaną grupą aminową za wyjątkiem β -alaniny oraz dodatkowo histydyna, arginina, leucyna i cystyna. Glicyna jest aminokwasem wydalany w największej ilości — średnio 28,2 mg/dobę. W stosunkowo dużych ilościach wydalany jest także kwas glutaminowy — średnio 20,0 mg/dobę. Dobowe wydalanie innych aminokwasów jest znacznie mniejsze i wynosi na przykład dla α -alaniny 9,3 mg/dobę, a dla treoniny 5,8 mg/dobę. Uzyskane wyniki odnośnie ludzi zdrowych pokrywają się z wynikami autorów badających peptydy w moczu ludzi (13, 20). Oznaczone w naszej pracy aminokwasy występują bowiem w peptydach wykrytych przez cytowanych wyżej

autorów z uwzględnieniem różnic powstałych na skutek stosowanej metody — niszczenie aminokwasów końcowych w czasie ich reakcji z ninhydryną. U chorych z podwyższonym poziomem mocznika we krwi stwierdzono wydalanie tych samych aminokwasów peptydowych co u ludzi zdrowych.

W tab. 2 zebrano wyniki oznaczeń ilościowych peptydowych aminokwasów wydalanych z moczem ludzi zdrowych i chorych. Zamieszczono również wartości F° dla poszczególnych aminokwasów, obliczone na maszynie numerycznej. Tylko w przypadku treoniny, przeprowadzona analiza wariancji wykazała istotne różnice pomiędzy średnimi oznaczeń dla trzech badanych grup. F° dla tego aminokwasu jest większe od wartości $F_{0,01}$ odczytanej z tabeli (tab. 2). Przeprowadzone 1% i 5% przedziały ufności T pomogły ustalić, że istotna różnica występuje konkretnie pomiędzy średnimi poziomami w pierwszej i trzeciej badanej grupie. Na tej podstawie możemy stwierdzić spadek ilości wydalanej z moczem i związanej w peptydach treoniny wraz ze wzrostem poziomu mocznika. Spadek ten jest jednak niewielki i zaznacza się wyraźnie dopiero przy przekroczeniu 150 mg% mocznika we krwi. Odnosnie pozostałych aminokwasów analiza wariancji wykazała brak istotnych różnic pomiędzy średnimi oznaczeniami dla trzech badanych grup ludzi, to znaczy, że ilości wydalanych z moczem pozostałych aminokwasów peptydowych nie różnią się istotnie w zależności od poziomu mocznika we krwi. Podobnie jak w przypadku aminokwasów N-podstawionych, zmiany stwierdzane w moczu ludzi chorych są niewielkie i dotyczą tylko jednego aminokwasu — treoniny.

Aminokwasy wolne

Analiza jakościowa moczu wykazała obecność w formie wolnej wszystkich aminokwasów stwierdzonych uprzednio w połączeniach z zablokowaną grupą aminową. Wyniki ilościowe zestawiono w tab. 3.

Jak widać z tab. 3, wraz ze wzrostem poziomu mocznika, występuje nieznaczny spadek wydalania wolnych aminokwasów. Przeprowadzona analiza statystyczna wykazała jednak, że jedynie kwas asparaginowy obniża się istotnie w moczu dobowym wraz ze wzrostem poziomu mocznika we krwi, przy czym istotne różnice występują pomiędzy średnimi dla grupy kontrolnej i pierwszej grupy chorych oraz grupy kontrolnej i drugiej grupy chorych. Brak jest istotnych różnic pomiędzy średnimi dla obu grup chorych.

Ogólnie można stwierdzić, że ilość wydalanych z moczem aminokwasów (we wszystkich badanych formach) stosunkowo mało zależy od stopnia schorzenia. W niewydolności nerek następuje głównie upośledzenie przesączania aminokwasów. Ponieważ jednak towarzyszy mu także

Tab. 3. Wolne aminokwasy w moczu ludzi zdrowych i chorych w mg/dobę
Free amino acids in urine of normal subjects and patients in mg/day

Aminokwasy	Ludzie zdrowi		Chorzy grupa 1		Chorzy grupa 2		F _{0.01}
	średnie stężenie	zakres	średnie stężenie	zakres	średnie stężenie	zakres	
Lizyna	23,40	19,2—26,6	21,70	17,2—27,8	20,90	16,5—24,2	1,98
+ Kwas asparaginowy	8,20	6,0—10,3	6,00	4,4—8,3	5,20	4,3—7,0	16,91
Glicyna	122,40	113,3—126,8	125,60	118,0—130,3	120,20	109,6—131,1	3,19
Seryna	29,20	22,1—34,3	28,30	20,6—32,9	26,10	21,4—29,6	1,67
Kwas glutaminowy	22,19	9,8—14,6	11,00	8,6—13,4	9,40	6,7—12,8	5,45
Treonina	20,20	17,3—25,8	21,80	16,0—25,8	19,39	16,1—23,0	2,11
α-Alanina	26,82	23,4—33,4	24,30	22,3—28,1	23,10	17,4—27,3	3,74
Walina	8,80	6,4—12,4	7,10	5,3—10,3	6,10	5,2—9,2	5,28

+ oznaczono różnice statystycznie istotne

+ statistically significant differences were marked

upośledzenie resorpcji zwrotnej, więc ostatecznie poziomy aminokwasów w moczu zmieniają się nieznacznie. Dane te pokrywają się na ogół z literaturą (5). Podstawowe czynniki wpływające na aminoacydurię to rozpad białka i towarzyszący mu wzrost aminoacidemii, upośledzenie filtracji kłębkowej oraz upośledzenie wchłaniania zwrotnego. Na aminoacydurię wpływa także stosowana w mocznicy dieta oraz nasilenie procesów enzymatycznych (11). Uzyskane wyniki wskazują na złożoność patomechanizmu mocznicy i konieczność dalszych badań nad metabolizmem aminokwasów w niewydolności nerek.

PIŚMIENICTWO

1. Bock H. E., Gerok W.: *Deutsch. Med. Wschr.* **86**, 704—710, 1961.
2. Boulanger P., Biserte G., Courtot F.: *Bull. Soc. Chim. Biol.* **34**, 366—379, 1952.
3. Burzyński S., Czerniak Z.: *Chem. Anal.* **14**, 667—671, 1969.
4. Burzyński S., Czerniak Z.: *Chem. Anal.* (w druku).
5. Cucuzza S., Lumare A.: *Min. Pediat.* **18**, 1486—1491, 1966.
6. Czerniak Z.: *Experientia* **25**, 443, 1969.
7. Czerniak Z., Burzyński S.: *Chem. Anal.* **14**, 673—676, 1969.
8. Czerniak Z., Burzyński S.: *Clin. Chim. Acta*, **24**, 367—372, 1969.
9. Frimpter G. W., Thompson D. D., Luckey E. H.: *J. Clin. Invest.* **40**, 1208—1216, 1961.
10. Geer R. P., Hautman R. K., Swet C. V.: *Clin. Chem.* **14**, 12—21, 1968.
11. Gerok W.: *Nierenfunktion, Aminosäurenblutspiegel und Aminoacidurie* (praca habilitacyjna). Marburg 1962.
12. Guzzi M., de Loze C.: *Giorn. Biochim.* **4**, 48—57, 1955.
13. Keller M., Patake G.: *Klin. Wochschr.* **44**, 99—100, 1966.
14. Krzeczowska I., Burzyński S., Czerniak Z.: *Ann. Univ. M. Curie-Skłodowska, Sec. D.* **21**, 125—134, 1966.
15. Krzeczowska I., Czerniak Z., Burzyński S.: *Ann. Univ. M. Curie-Skłodowska, Sec. D.* **21**, 313—322, 1966.
16. Ling N. R.: *Biochem. J.* **59**, X, 1955.
17. Markovitz A., Steinberg D.: *J. Biol. Chem.* **228**, 285—293, 1957.
18. McCaldin D. J.: *Chem. Rev.* **60**, 39—51, 1960.
19. Przybylska J., Kociałkowski Z., Wiewiórowski M.: *Rocz. Nauk Roln.* **79**, 1—17, 1958.
20. Sarnecka-Keller M., Noworytko J., Kos S.: *Acta Biochem. Polon.* **11**, 221—226, 1964.
21. Satwekar K., Radhakrishnan A. N.: *Clin. Chim. Acta* **12**, 394—402, 1965.
22. Scheffé H.: *The Analyses of Variance*. New York 1959.
23. Stein W. H.: *J. Biol. Chem.* **201**, 45—58, 1953.
24. Szumiel I., Chmielewska I., Manicki J.: *Acta Physiol. Polon.* **17**, 433—443, 1966.
25. Tukey J. W.: *The Problem of Multiple Comparisons*. Princetown 1953.
26. Williams R. J., Kirby H.: *Science* **107**, 481—483, 1948.

Otrzymano 16 II 1970.

РЕЗЮМЕ

Определили количественно N-замещенные аминокислоты в моче здоровых людей и людей больных недостаточностью почек. Исследовали также выделение пептидовых и свободных аминокислот, определяя количество соединений, обнаруженных раньше в N-замещенной форме. Не обнаружено качественных разниц между составами исследованных аминокислот в почке здоровых людей и людей больных недостаточностью почек. Статистический анализ результатов дал возможность определить значительные увеличения выделения N-замещенного глицина в моче тех больных, у которых концентрация мочевины в крови была выше 150 mg%. Одновременно с этим у этих больных наступает значительное понижение экскреции пептидового треонина. Относительно свободных аминокислот констатировано понижение выделения аспарагиновой кислоты в моче больных, у которых концентрация мочевины в крови была выше 45 mg%.

SUMMARY

N-substituted amino acids were determined in urine of healthy persons and patients with renal insufficiency. The urinary excretion of peptide and free amino acids was also examined but the quantitative determinations were limited to the compounds found previously in N-substituted form. There were not found any qualitative differences between healthy individuals and patients in the composition of the investigated amino acids. Statistical analysis established the significant increase of N-substituted glycine excretion in urine of patients with serum urea level higher than 150 mg%. The same patients excreted peptide threonine in significantly smaller quantities. The examinations of free amino acid concentration showed the decrease of aspartic acid excretion in urine of patients with serum urea level higher than 45 mg%.

