



INHIBITORY TRYPSYNY W MŁODZIWIIE KROWY I ŚWINI

Michał Laskowski, Sr.

Roswell Park Memorial Institute,
Buffalo N.Y. USA

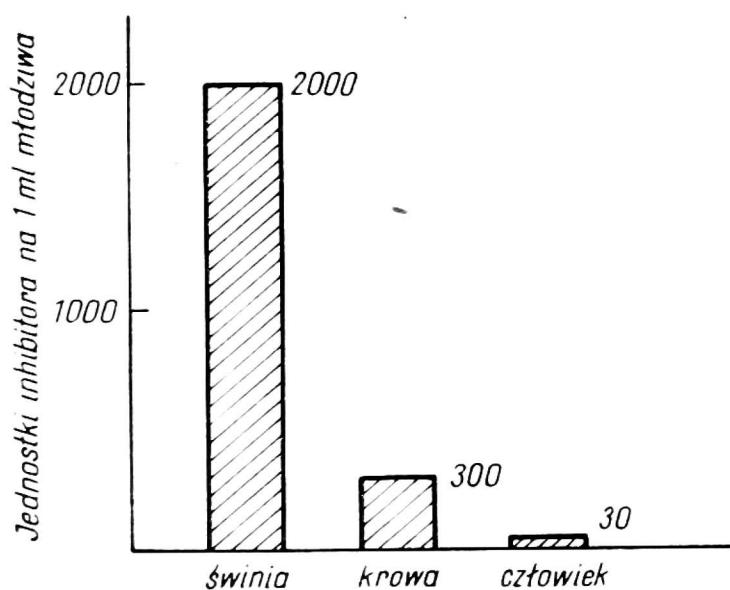
Tematem mego wykładu będą przeważnie badania nad inhibitorami trypsyny w młodziwie, wykonane w moim laboratorium najpierw w Milwaukee, później w Buffalo. Ten wybór nie jest spowodowany chęcią samochwalstwa. Lwia część naszej pracy była ściśle chemiczna i dotyczyła szczegółowej struktury inhibitorów. Tę część pominię całkowicie. Wydaje mi się, że hodowców bardziej interesują biologiczne implikacje tych badań. Wybrałem tematy z naszej pracowni przez lenistwo. Łatwiej mi mówić o nich, bo znam je gruntownie. Nie mam też zamiaru twierdzić, że prace te wykonywałem sam. Mój udział ograniczał się do znalezienia utalentowanych współpracowników. Byli to: M. Laskowski Jr., R. J. Peanasky, F. C. Wu, B. Kasseu, R. P. Miech, H. A. Haessler, L. K. Kress, S. L. Schneider, S. R. Martin, H. Możejko, L. Stasiuk, A. Kucich i K. A. Wilson.

Obecność inhibitora w młodziwie krowy została wykryta w 1948 r. przez mego syna, wówczas studenta drugiego roku chemii. Jak to często bywa, odegrał tu rolę przypadek. W laboratorium była potrzebna oksydaza ksantynowa. W owym czasie nie było handlowych preparatów enzymów; trzeba było przygotowywać je samemu. W trakcie przygotowywania używano się trypsyny w celu strawienia otoczek białkowych, ochraniających kuleczki tłuszczowe. Okazało się, że pewne próbki śmietanki wymagają znacznie więcej trypsyny, aby uwolnić oksydazę ksantynową. Syn założył, że to jest spowodowane obecnością czynnika ha-

mującego trypsynę i oznaczył ilości inhibitora w kilkunastu próbkach śmietanki. Wahania były ogromne. Wtedy zdecydował się oznaczyć inhibitor w świeżym młodziwie i znalazł zawartość inhibitora 1000-krotnie większą. W ciągu następnych 2 lat syn wyizolował i wykrył inhibitor [1, 2]. Nawet przy ówczesnych metodach, analiza homogenności krystalicznego materiału nie była całkowicie zadowalająca [3]. Obecnie wiemy, że było to spowodowane obecnością izoinhibitorów. Wróćmy do tej sprawy przy końcu wykładu.

W owym czasie zdawano sobie już sprawę z tego, że przeciwciała krążące we krwi znajdują się we frakcji gamma-globulin, które łatwo jest uwidocznic metodami elektroforetycznymi. Krew noworodków niektórych gatunków zwierząt wykazywała albo zupełny brak gamma-globulin albo bardzo niski ich poziom. U tych gatunków, u których gamma-globuliny przechodzą do krwi płodu przeważnie przez łożysko (np. człowiek), noworodki mają gamma-globulinę we krwi. U gatunków, które przekazują przeciwciała wyłącznie przez młodziwo (np. świnia i owca), krew noworodków nie zawiera gamma-globulin. Zjawiają się one w krwioobiegu dopiero po pierwszym karmieniu. Stąd wynikają trudności hodowania takich noworodków na pożywkach sztucznych.

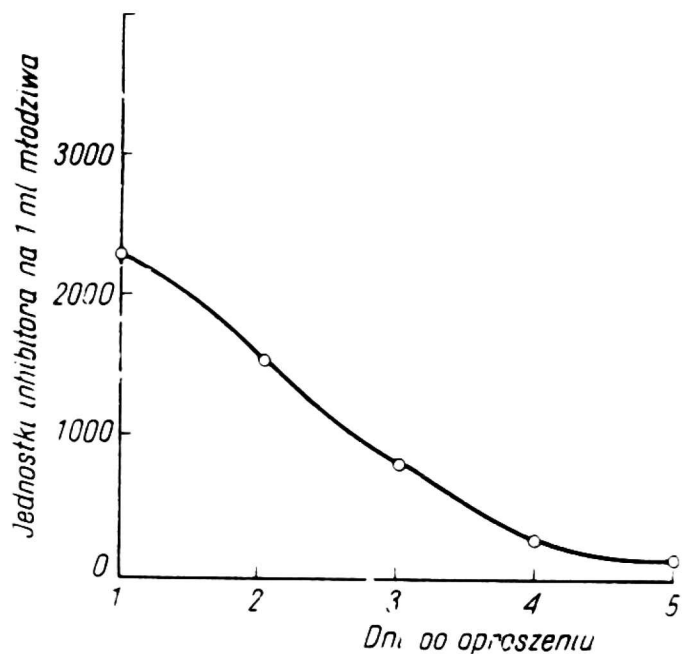
Wykrycie inhibitora trypsyny w młodziwie nasunęło wiele nowych zagadnień. Przede wszystkim należało sprawdzić, czy istnieje korelacja pomiędzy poziomem inhibitora w młodziwie a rolą młodziwa w przekazywaniu przeciwciał. Rysunek 1 ilustruje różnice gatunkowe.



Rys. 1. Zawartość inhibitora trypsyny w młodziwie w pierwszym dniu po porodzie

Człowiek ma bardzo niskie stężenie inhibitora i przekazuje przeciwciała wyłącznie przez łożysko; krowa zajmuje miejsce pośrednie, świnia przekazuje przeciwciała wyłącznie przez młodziwo. Doświadczenia wykazują istnienie korelacji i potwierdzają przypuszczenie, że inhibitor może grać rolę w ochronie przekazywanych przeciwciał.

W owym czasie wiedziano już, że ilość gamma-globulin jest najwyższa w młodziwie w pierwszym dniu po porodzie, spada w dniach następnych, znikając zupełnie między 5 a 7 dniem. Rysunek 2 wykazuje, że zawartość inhibitora w młodziwie ma podobny przebieg [4], więc znów koreluje z zawartością przeciwciał. Fizjologiczne badania nad przepuszczalnością bariery jelitowej wskazywały, że to zjawisko ma podobnie przebiegającą krzywą; przepuszczalność jest największa u noworodków, zmniejsza się w ciągu następnych dni.



Rys. 2. Zawartość inhibitora trypsyny w młodziwie lochy

Aby inhibitor w młodziwie mógł spełnić rolę fizjologiczną w ochronie przeciwciał, jeszcze jeden warunek musi być spełniony. Inhibitor musi być odporny na trawienie sokiem żołądkowym. W tabeli 1 zestawiliśmy półokres trwania kilku inhibitorów w roztworze pepsyny, odpowiadającym normalnemu sokowi żołądkowemu człowieka.

Jak widać z tabeli 1, inhibitor z młodziwa krowy jest stosunkowo odporny na normalne trawienie pepsynowe. Inhibitor z młodziwa świni jest jeszcze bardziej odporny. W doświadczeniu nie zamieszczonym w tej tabeli, poddaliśmy inhibitor świni trawieniu w 0,05% roztworze pepsyny. Czas półtrwania wynosił około 24 godziny. Jeśli weźmie się pod uwagę, że sok żołądkowy noworodków ludzkich jest uboższy zarówno w pepsynę, jak i kwas solny — prawdopodobieństwo, że ogromna ilość inhibitora przeżywa trawienie żołądkowe staje się pewnością.

Zdecydowaliśmy wówczas, że nadszedł czas na pokuszenie się o bezpośrednie wykazanie, że inhibitor umożliwia przekroczenie bariery jelitowej [6]. Do doświadczeń użyliśmy szczury wążące około 150 g. Były to więc zwierzęta na pół dorosłe, a zatem bariera jelitowa była już słabo przepuszczalna. Jako ciało ochraniane wybraliśmy insulinę ze względu

Tabela 1

Porównanie oporności inhibitorów na trawienie pepsynowe

Źródło inhibitora	Czas półtrwania w 0,01% pepsynie, pH 1,5, temp. 37°C
Krew wołu	30 s
Trzustka wołu ^a	5 min
Owomukoid	13 min
Soja (groch)	44 min
Młodziwo krowy	180 min
Młodziwo świni	100 godz
Trzustka wołu ^b	3 tygodnie

^a Według Kazala. ^b Według Kunitza; pozostałe dane — według badań własnych autora.

na łatwe oznaczanie ilości wchłoniętej, mierzonej spadkiem poziomu glukozy we krwi, pobieranej z ogona. U szczura (pod narkozą) izolowano pętlę jelita cienkiego (jejunum). Do pętli wprowadzano badane roztwory. Zostały wykonane trzy typy doświadczeń kontrolnych. W pierwszym wstrzykiwano tylko sól fizjologiczną, w drugim — sól fizjologiczną z inhibitorem, w trzecim — sól fizjologiczną z 250 jednostkami insuliny.

W doświadczeniach podanych w tabeli 2 kontrola zawiera tylko insulinę, w doświadczeniu drugim i trzecim podano prócz insuliny 40 lub 250 mg inhibitora. Normalny poziom glukozy u szczura w narkozie pentotanowej wynosi od 70 do 90 mg na 100 ml. W doświadczeniu drugim (40 mg inhibitora) poziom glukozy we krwi zaczyna opadać po godzinie i po trzech godzinach znowu się podnosi. W doświadczeniu trzecim poziom spada po godzinie i pozostaje bardzo niski aż do 6 godzin. Pomimo tego dramatycznego obniżenia poziomu glukozy ilość insuliny, która przeszła przez barierę jelitową była stosunkowo mała i wynosiła około 3% insuliny, wprowadzonej dojelitowo. Z praktycznego punktu widzenia doświadczenie to nie ma żadnego znaczenia, bo wymaga wprowadzenia równoważnika 10 krów na jednego szczura w celu wywołania efektu. Co gorsza, cena inhibitora jest bardzo wysoka, co już dyskwalifikuje go jako środek umożliwiający podawanie insuliny w pigułce. Nie o to jednak chodziło. Doświadczenie wykazało, że inhibitor umożliwia przechodzenie bariery jelitowej, ponieważ ochrania insulinę od trawienia.

Na tym prawie kończą się badania biologicznych aspektów inhibitorów w młodzie. Ale, jak często bywa w życiu, nowe fakty wprowadzają nowe kłopoty. Na początku referatu zwróciłem uwagę na to, że

Tabela 2

Zawartość glukozy we krwi szczura po wprowadzeniu dojelitowo 250 jednostek insuliny lub insuliny z podaną ilością inhibitora

Czas (min)	Ilość inhibitora w mg		
	0	40	250
0	80	70	70
30	78	70	80
60	80	75	70
90	78	45	40
120	76	40	35
150	90	30	35
180	78	—	35
210	90	50	30
240	85	65	25
270			20
300			15
330			15
360			15

analizy chemiczne nie potwierdzały wysokiej homogenności inhibitorów z młodziwa.

Inhibitor z młodziwa świni został wyizolowany i poddany dalszemu oczyszczaniu na kolumnie DE-52 [7]. Otrzymaliśmy 4 frakcje wykazujące prawie identyczną aktywność specyficzną. Każda z tych frakcji została poddana dalszemu oczyszczaniu, przy pomocy *equilibrium chromatography*, to jest chromatografii w warunkach, w których kolumna i próbka są doprowadzone do tej samej siły jonowej i pH. Metody tej używamy zarówno jako preparatywnej, jak i analitycznej. W tym ostatnim przypadku o homogenności decyduje fakt, że specyficzna aktywność jest stała przez cały przebieg szczytu (tzw. pik) danej frakcji. Po tym oczyszczeniu otrzymaliśmy cztery izoinhibitory, które były homogene zarówno w elektroforezie żelowej, jak i w *equilibrium chromatography*. Poddaliśmy każdy izoinhibitor analizie składu aminokwasowego i węglowodanowego. Różnice były bardzo niewielkie. Są one zestawione w tabeli 3.

Izoinhibitor I zawiera jedną resztę kwasu siałowego; izoinhibitor II ma jedną resztę lizyny zamiast dwóch; izoinhibitor III ma jedną resztę glukozy, której nie ma izoinhibitor IV.

Wykonaliśmy podobne badania z inhibitorem z młodziwa krowy i otrzymaliśmy aż 10 izoinhibitorów, różniących się zarówno składem części węglowodanowej, jak i białkowej [8]. Co do tej ostatniej, to izo-

inhibitory **układają** się w 3 grupy: z jedną, dwiema i trzema resztami lizyny. **Została** też spostrzeżona różnica w zawartości kwasu asparagino-
wego. Dwa **izoinhibitory** zawierały 7 reszt, podczas gdy pozostałe —
8 reszt **tego kwasu**. Różnice w składzie części cukrowej sprowadzały się
do obecności **lub braku** jednej reszty kwasu siałowego. Jestem skłonny
przypuszczać, że zarówno w przypadku izoinhibitorów świni jak i krowy
brak kwasu **siałowego** może być artefaktem. W czasie izolowania inhi-
bitora **używaliśmy** 5% kwasu trójchlorooctowego (80°C). Oczyszczony
izoinhibitor, **zawierający** kwas siałowy, został poddany ponownie dzia-
łaniu kwasu trójchlorooctowego w 80°C przez 10 minut. Po upływie
tego czasu **wykonano** chromatografię. Izoinhibitor został rozdzielony na
dwa, z **których tylko** jeden zawierał kwas siałowy.

Tabela 3

Różnica w składzie chemicznym izoinhibitorów z młodziwa świni

Składniki	Izoinhibitory			
	I	II	III	IV
Lizyna	1,23	2,10	2,17 ^a	1,97
C-końcowy aminokwas	Treonina	Lizyna	Lizyna	Lizyna
Kwas siałowy	0,81	0,0	0,06	0,01
Glukoza	0,04	0,0	0,0	0,95

^a Analiza nie wykryła powodu, dla którego izoinhibitory II i III zostały rozdzielone. Wszystkie inne składniki (nie podane w tabeli) były jednakowe. Najbardziej prawdopodobnym powodem rozdziału izoinhibitorów II i III wydaje się różnica w ilości grup amidowych. Nie były one oznaczone.

Trudno jest jednak przypuszczać, żeby warunki oczyszczania inhi-
bitorów **mogły spowodować** zmiany składu aminokwasów. Wiązania
peptydowe **są o tyle trwałe**, że nie można sobie wyobrazić, żeby w czasie
preparowania reszta lizynowa mogła się odszczepić. Wydaje się znacznie
bardziej prawdopodobne, że wykryte różnice w składzie aminokwasów
reprezentują **genetyczną historię** udomowionego gatunku. I teraz zaczy-
niają się **kłopoty**. Dotychczas pracowaliśmy wyłącznie nad materiałem
pochodzącym od wielu osobników. Czystość genetyczna zwierząt — daw-
ców młodziwa, **nie była przestrzegana**. Przy obecnie dostępnych meto-
dach ich **czułość** nie pozwala na pracę nad jednym tylko osobnikiem.
Tym niemniej zostało otwarte nowe zagadnienie o implikacji biologicz-
nej. Z **punktu widzenia** zainteresowania hodowców zagadnienie to sta-
łoby się **ważne**, gdyby mutacje składu aminokwasów inhibitora pokry-
wały się z **innymi cechami**, pożądanymi w hodowli.

STRESZCZENIE

Obecność inhibitora trypsyny w młodziwie* krowy została wykryta w 1948 r. Wkrótce potem inhibitor został wykrystalizowany. Nawet ówczesne kryteria czystości wzbudzały wątpliwość, co do jednorodności krystalicznego preparatu. Podobne wątpliwości istniały w stosunku do inhibitora z młodziwa świni, wykrytego w 1957 r.

Znaczenie fizjologiczne inhibitora wydaje się polegać na zabezpieczeniu przeciwciał, znajdujących się w młodziwie, przed strawieniem przez trypsynę w przewodzie pokarmowym noworodka. Te gatunki zwierząt, które przekazują potomstwu przeciwciała przede wszystkim przez gruczoł mleczny (np. świnię), mają bardzo wysoki poziom inhibitora w młodziwie. Gatunki, które zajmują miejsce przejściowe pod względem zawartości inhibitora (np. krowa), przekazują przeciwciała zarówno przez gruczoł mleczny, jak przez łożysko. Wreszcie gatunki, które przekazują przeciwciała przeważnie przez łożysko (np. człowiek), mają bardzo niski poziom inhibitora w młodziwie.

Dodatkowe poparcie tego rozumowania wynika z doświadczeń, w których wprowadzano do pętli jelitowej dorosłego szczura inhibitor razem z insuliną. Około 3⁰/₀ insuliny przeszło do krwi, podczas gdy w doświadczeniach kontrolnych, w których nie podano inhibitora, absorpcja insuliny nie nastąpiła. Doświadczenia te przemawiają za rolą inhibitora w przyswajaniu przeciwciał.

Badania chemiczne doprowadziły do wyizolowania czterech izoinhibitorów z młodziwa świni i co najmniej dziesięciu z młodziwa krowy. Wszystkie zawierają poza białkiem także cukrowce.

Analizy wykazały, że izoinhibitory krowy różnią się nie tylko w składzie części cukrowej, lecz i w składzie aminokwasowym, zawierając 1, 2 lub 3 reszty lizynowe, 7 lub 8 reszt kwasu asparaginowego, 3 lub 4 reszty tyrozyny. Spostrzeżono także różnice w składzie innych aminokwasów, jak również w obecności kwasu sialowego. Wielka liczba izoinhibitorów wyizolowanych z młodziwa krowy przypuszczalnie odzwierciedla genetyczną historię gatunku.

LITERATURA

1. Laskowski M., Jr., Laskowski M., Sr.: Federation Proc., 9, 194, 1950.
2. Laskowski M., Jr., Laskowski M., Sr.: J. Biol. Chem., 190, 563, 1951.
3. Laskowski M., Jr., Mars P. H., Laskowski M., Sr.: J. Biol. Chem., 198, 745, 1952.
4. Laskowski M., Sr., Kassel B., Hagerty G.: Biochim. Biophys. Acta, 24, 300, 1957.
5. Kassel B., Laskowski M., Sr.: J. Biol. Chem., 219, 203, 1956.
6. Laskowski M. Jr., Haessler H. A., Miech R. P., Peanasky R. J., Laskowski M., Sr.: Science, 127, 1115, 1958.

* Młodziwo — obecnie stosowana nazwa — siara.

7. Kress L. F., Martin S. R., Laskowski M., Sr.: *Biochim. Biophys. Acta*, 229, 836, 1971.
8. Kucich U.: Thesis, Suny at Buffalo, 1972.

Michał Laskowski Sr.

ИНГИБИТОРЫ ТРИПСИНА В МОЛОЗИВЕ КОРОВЫ И СВИНОМАТКИ

Резюме

Присутствие ингибитора трипсина в молозиве коровы обнаружено в 1948 г. Вскоре после того этот ингибитор кристаллизировали. Даже тогдашний критерий чистоты вызывал сомнение относительно однородности кристаллизованного препарата. Такие же сомнения касались чистоты ингибитора изолированного в 1957 г. из молозива свиноматки.

Физиологическое значение ингибитора повидимому, заключается в предохранении антител находящихся в молозиве от их переваривания (распада) трипсином в пищеварительном тракте новорожденных животных. Виды животных, которых самки передают потомству антитела главным образом через молочную железу (нпр. свиноматки) выделяют молозиво с высоким содержанием ингибитора. Самки видов занимающих промежуточное место в отношении содержания ингибитора в молозиве (нпр. коровы) передают антитела так через вымя как и через послед. Наконец у видов, у которых антитела передаются преимущественно через послед (нпр. человек), молозиво содержит очень низкий уровень ингибитора.

Дополнительным доказательством такого мышления являются результаты опытов, в которых в кишечную петлю взрослой крысы вводили ингибитор вместе с инсулином. Около 3 процента добавленного инсулина проходило в кровь, зато у крыс контрольных, не получающих ингибитор, не наблюдали всасывания поданного инсулина. Результаты этих опытов являются доказательством роли ингибитора в усваивании антител.

Химические исследования привели к изоляции четырех изо-ингибиторов из молозива свиноматок и по крайней мере десять из молозива коров. Все они, наряду с протеином, содержат тоже сахараиды. Анализами обнаружено, что изо-ингибиторы молозива коровы различаются не только составом сахарной части, но и аминокислотным составом, содержа 1, 2 или 3 остатка лизина, 7 или 8 остатков аспарагиновой кислоты, 3 или 4 остатка тирозина. Обнаружили тоже изменения в составе других аминокислот, а также колебания в содержании сиаловой кислоты. Большое количество изо-ингибиторов выделенных из молозива коровы, повидимому, отражает генетическую историю вида.

Michał Laskowski, Sr.

TRYPsin INHIBITORS FROM COLOSTRUM OF COW AND SWINE

Summary

The presence of a trypsin inhibitor in cow colostrum was discovered in 1948. Shortly thereafter the inhibitor was crystallized. Even with the then available criteria of purity, the homogeneity of the crystalline preparation was not entirely

satisfactory. Similar doubts existed with respect to swine colostrum trypsin inhibitor discovered in 1957.

The physiological significance of the inhibitor appears to be protection of antibodies contained in colostrum from tryptic digestion by the newborn. Animal species that transmit antibodies predominantly through the mammary gland (e.g. swine) have a very high level of inhibitor in colostrum. The species that occupy an intermediate position in the content of inhibitor (e.g. cow) transmit by both routes, mammary and placenta. The species that transmit predominantly across placenta (e.g. human) have a very low level of trypsin inhibitor in colostrum. Another line of supporting evidence comes from experiments in which inhibitor and insulin were introduced into a loop of jejunum of an adult rat. About 3% of the insulin was absorbed, while none was absorbed in a control animal receiving no inhibitor. The results of the experiment, strongly support the postulated physiological significance in the process of transmitting antibodies.

Chemical studies led to isolation of 4 isoinhibitors from the colostrum of swine and no less than 10 from the colostrum of cow. All isoinhibitors contained carbohydrate. The analyses show differences among isoinhibitors in both the carbohydrate moiety and the amino acid composition. Cow isoinhibitors were found with 1, 2, and 3 lysine residues, with either 7 or 8 aspartic acid residues and either 3 or 4 tyrosines. Variation in other amino acids and in sialic acid content was also observed. The large number of isoinhibitors in cow probably reflects the genetic history of the species.