MAKSYM NIKONOROW, BOGUMIŁA URBANEK-KARŁOWSKA, KAZIMIERZ KARŁOWSKI

WPŁYW NIEDOBORÓW BIAŁKOWYCH U SZCZURÓW NA AKTYWNOŚĆ WYBRANYCH ENZYMÓW PRZEMIANY BIAŁKOWEJ I WĘGLOWODANOWEJ

Z Zakładu Badania Żywności i Przedmiotów Użytku Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie
Kierownik: prof. dr *M. Nikonorow*

Zbadano wpływ karmienia szczurów dietami o różnej zawartości białka (0, 4, 8, 12 i 24%) na aktywność aminotransferazy alaninowej i asparaginianowej oraz aldolazy fruktozodwufosforanowej i izomerazy glukozofosforanowej w surowicy krwi i wątrobie. Oznaczenia wykonywano po 24, 48 i 72 h oraz po 1, 2, 4, 8 i 12 tygodniach.

Piśmiennictwo dotyczące badań układów enzymatycznych w warunkach niedoborów pokarmowych nie jest obszerne, chociaż na przestrzeni kilku ostatnich lat obserwuje się znacznie większe zainteresowanie tymi zagadnieniami. Niedobór choćby jednego ze składników pożywienia prowadzi najpierw do zmian biochemicznych, następnie czynnościowych a w końcu daje charakterystyczne objawy chorobowe.

Często występują niedobory pewnych składników pokarmowych wynikające z nieodpowiedniego składu pożywienia. Głównie występuje niedobór białka, przy czym zwraca się uwagę na obecność białek pełnowartościowych zawierających aminokwasy egzogenne [2, 9].

Ze względu na to, że diety niskobiałkowe są jednocześnie wysokowęglowodanowymi, a procesy przeaminowywania stoją na pograniczu przemiany białkowej i węglowodanowej, uważano za celowe przebadanie w niniejszej pracy nie tylko aminotransferazy asparaginianowej (EC.2.6.1.1.) — AspAT i aminotransferazy alaninowej (EC.2.6.1.2.) — AlAT, ale również enzymów związanych z przemianą węglowodanową: aldolazy fruktozodwufosforanowej (EC.4.1.2.13.) — FDPA i izomerazy glukozofosforanowej (EC.5.3.1.9.) — PHI.

MATERIAŁ I METODYKA BADAŃ

Doświadczenie wykonano na 370 szczurach obu płci, rasy *Wistar*, hodowli własnej Zakładu, 4—5-tygodniowych, o ciężarze ciała 50—70 g. Zwierzęta podzielone na grupy po 5 szczurów w każdej, karmiono dietami o różnej zawartości białka (0, 4, 8, 12 i 24%).

Skład diety kontrolnej (24% białka), zapewniającej optymalne warunki wzrostu i rozwoju zwierząt przedstawiono w poprzedniej pracy [17]. Zmniejszenie zawartości białka w dietach badanych uzyskiwano kosztem zwiększenia ilości skrobi pszennej. Wszystkie diety były izokaloryczne. Zawartość białka w dietach oznaczono metodą *Kjeldahla*.

Przed rozpoczęciem podawania diet badanych wszystkie zwierzęta karmiono przez 7 dni dietą zawierającą 24% białka, aby wyrównać ewentualne braki żywieniowe w poprzedniej diecie [7]. Zwierzętom przez cały okres doświadczenia podawano paszę i wodę bez ograniczeń. Oznaczenia wykonywano po: 24, 48, 72 h oraz 1, 2, 4, 8 i 12 tygodniach. Czas karmienia zwierząt dietą bezbiałkową ograniczono do 2 tygodni ze względu na obserwowane duże wyniszczenie.

1976 k 62/97 Biblia... C-2805

Po upływie ustalonych okresów karmienia, szczury wykrwawiano przez nacięcie tętnicy szyjnej. Wątroby usuwano i umieszczano natychmiast w naczyniu chłodzonym lodem, po czym homogenizowano w szklanym homogenizatorze umieszczonym w lodzie, przez 2 min. przy 200—400 obr./min. biorąc 60 mg tkanki na 1 cm³ 0,9% roztworu NaCl. Następnie homogenaty wirowano przez 10 min. przy 2000 obr./min. celem usunięcia fragmentów tkanki wątrobowej. Homogenaty i surowice przechowywano w temp. 0—4 °C.

Oznaczeń aktywności enzymów dokonywano w surowicy krwi i homogenatach wątroby.

Aktywność aminotransferaz oznaczano metodą *Reitmana* i *Fränkela* [15] w modyfikacji *Jicha* [8], polegającej na zwiększeniu stężenia 2,4-dwunitrofenylohydrazyny do ilości odpowiadającej stężeniu ketokwasów w mieszaninie reakcyjnej. Dwukrotne zwiększenie stężenia tego związku podwyższą rozdział absorpcji hydrazonu kwasu pirogronowego i α-ketoglutarowego o 30% i wtedy absorpcja tego ostatniego jest bez znaczenia. Pomiarów dokonywano przy 505 nm. Przed wykonaniem oznaczeń homogenaty rozcieńczano w stosunku 1 : 20 buforem fosforanowym o pH 7,4, a surowice 1 : 5 w przypadku AspAT, dla oznaczenia aktywności AlAT używano surowic nierozcieńczonych. Zawartość pirogronianu (w μmolach) uwolnionego w czasie reakcji enzymatycznej w warunkach metody odczytywano z krzywej wzorcowej i wyrażano jako jednostki AspAT i AlAT. Aktywność aminotransferaz w surowicy wyrażano w jednostkach na cm³, a w homogenatach wątroby w tysiącach jednostek na 1 g świeżej tkanki. Aktywność izomerazy glukozofosforanowej oznaczano metodą *Bodansky'ego* [4]. Do oznaczeń pobierano 0,5 cm³ surowicy rozcieńczonej 1 : 20 roztworem soli fizjologicznej i 0,5 cm³ homogenatu rozcieńczonego 1 : 100 również 0,9% roztworem NaCl. Aktywność tego enzymu podawano w jednostkach *Bodanysky'ego* — w surowicy w przeliczeniu na 1 cm³, a w homogenatach w tysiącach jednostek na 1 g świeżej tkanki. Pomiarów dokonywano przy 490 nm.

Aktywność aldolazy fruktozodwufosforanowej oznaczano metodą *Brunsa* [5, 6] odmierzając 0,5 cm³ surowicy rozcieńczonej 1 : 10 buforem kolidydowym o pH 7,4 i 1 cm³ homogenatu rozcieńczonego 1 : 20. Absorbancję odczytywano przy 540 nm. Aktywność enzymu wyrażano w jednostkach *Brunsa*, przeliczając w surowicy na 1 cm³, zaś w homogenatach na 1 g świeżej tkanki $\times 10^2$.

Aktywność enzymów we wszystkich grupach badanych oznaczano zawsze równolegle z odpowiednią grupą kontrolną.

Ponadto oznaczano: poziom białka ogólnego w surowicy krwi, białka rozpuszczalnego w wątrobie, frakcje białkowe surowicy krwi oraz ciężar wątroby. Każdego dnia kontrolowano spożycie paszy i przyrost ciężaru ciała.

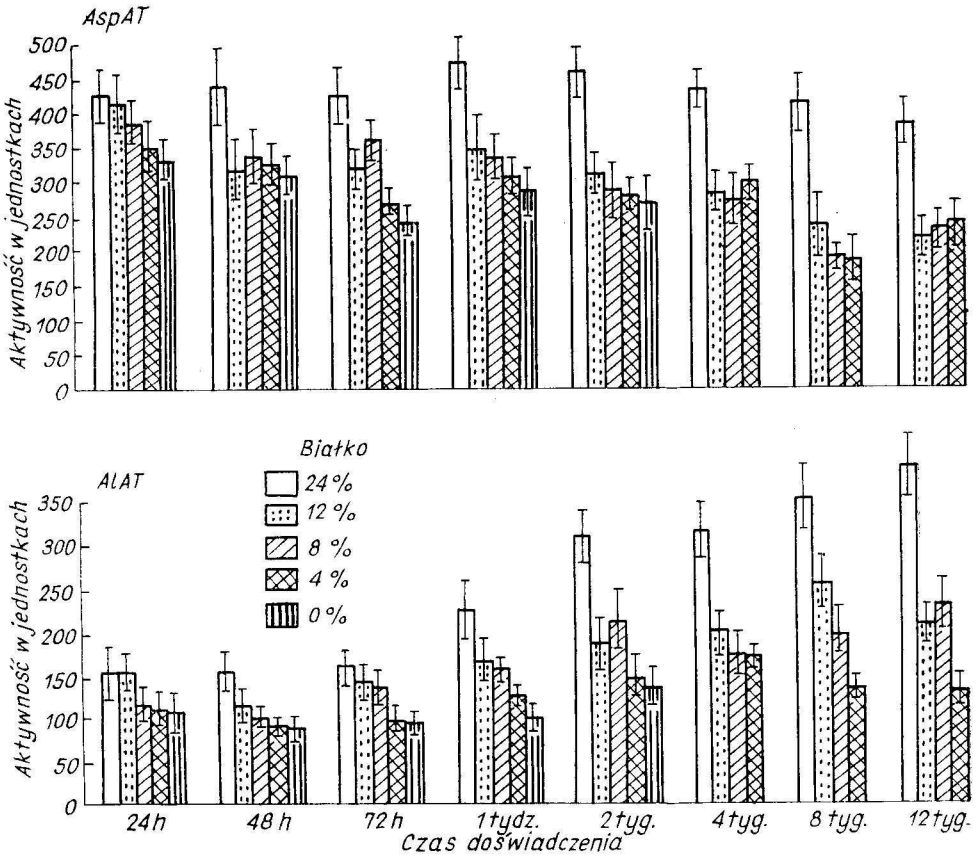
WYNIKI

Ogólnie można stwierdzić, że aktywność enzymów przemiany białkowej w wątrobie ulega zmniejszeniu pogłębiającemu się w miarę obniżania poziomu białka w diecie oraz czasu trwania doświadczenia. W surowicy krwi obserwowano natomiast wzrost aktywności.

Największe zmiany w homogenatach wątroby stwierdzono w przypadku AlAT. Już po 24 h obserwowano zmniejszenie aktywności tego enzymu w grupach otrzymujących 8 i 4% białka oraz bezbiałkowej. Począwszy od pierwszego tygodnia doświadczenia obniżenie aktywności tego enzymu było zaznaczone wyraźnie we wszystkich grupach zwierząt, w porównaniu z otrzymującymi 24% białka w diecie. Zaobserwowano wzrost aktywności AlAT wraz z wiekiem zwierząt.

Aktywność AspAT również zmniejszyła się pod wpływem obniżenia poziomu białka w diecie. Zmniejszenie to utrzymywało się przez cały okres podawania diet niskobiałkowych. Stwierdzony spadek aktywności AspAT był ilościowo mniejszy niż AlAT. Zmiany aktywności AspAT i AlAT w wątrobie szczurów wywołane żywieniem niedoborowym w białko przedstawiono na ryc. 1.

Aktywności enzymów związanych z przemianą węglowodanów ulegały znacznie mniejszym zmianom pod wpływem obniżenia ilości białka w diecie (ryc. 2). Aktywność aldolazy fruktozodwufosforanowej w wą-



Ryc. 1. Aktywność aminotransferaz: asparaginianowej (AspAT) i alaninowej (AlAT) w wątrobie szczurów w zależności od poziomu białka w diecie.

trobie wykazywała tendencje wzrostowe. Zmniejszenie jej aktywności było jedynie widoczne u szczurów karmionych dietą bezbiałkową.

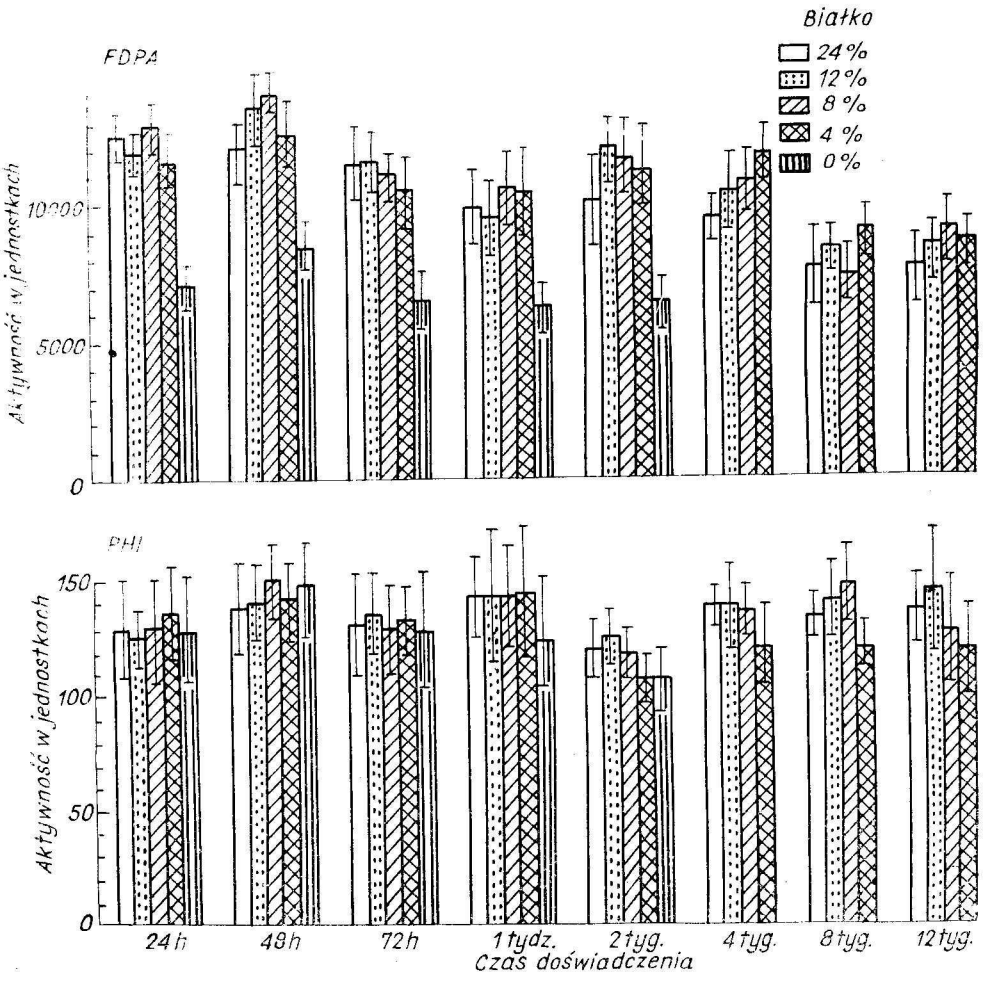
Stwierdzono spadek aktywności izomerazy glukozofosforanowej po 2, 4, 8 i 12 tygodniach karmienia szczurów dietą o 4% zawartości białka oraz po 1 i 2 tygodniach — dietą bezbiałkową.

Aktywności badanych enzymów w surowicy krwi szczurów karmionych dietami o różnej zawartości białka przedstawiono na ryc. 3 i 4. Karmienie deficytowe szczurów w mniejszym stopniu wpływało na aktywność AlAT w surowicy krwi, w porównaniu ze zmianami jakie obserwowano u tych zwierząt w wątrobie. Nie obserwowano zmian aktywności AspAT w surowicy krwi.

Aktywność PHI zmniejszyła się po 1, 4 i 8 tygodniach tylko w grupie zwierząt otrzymujących 4% białka w diecie.

Zmiany aktywności FDPA wystąpiły po 12 tygodniach karmienia — obserwowano wzrost u szczurów karmionych paszą o 4 i 12% zawartości białka. Natomiast zmniejszenie aktywności tego enzymu stwierdzono po 1 tygodniu karmienia dietą o 4% poziomie białka oraz po 1 i 2 tygodniach podawania szczurom diety pozbawionej białka.

Wpływ zawartości białka w paszy na jej spożycie przez szczury, przyrost ciężaru ciała zwierząt, ciężar wątroby, poziom białka rozpusz-



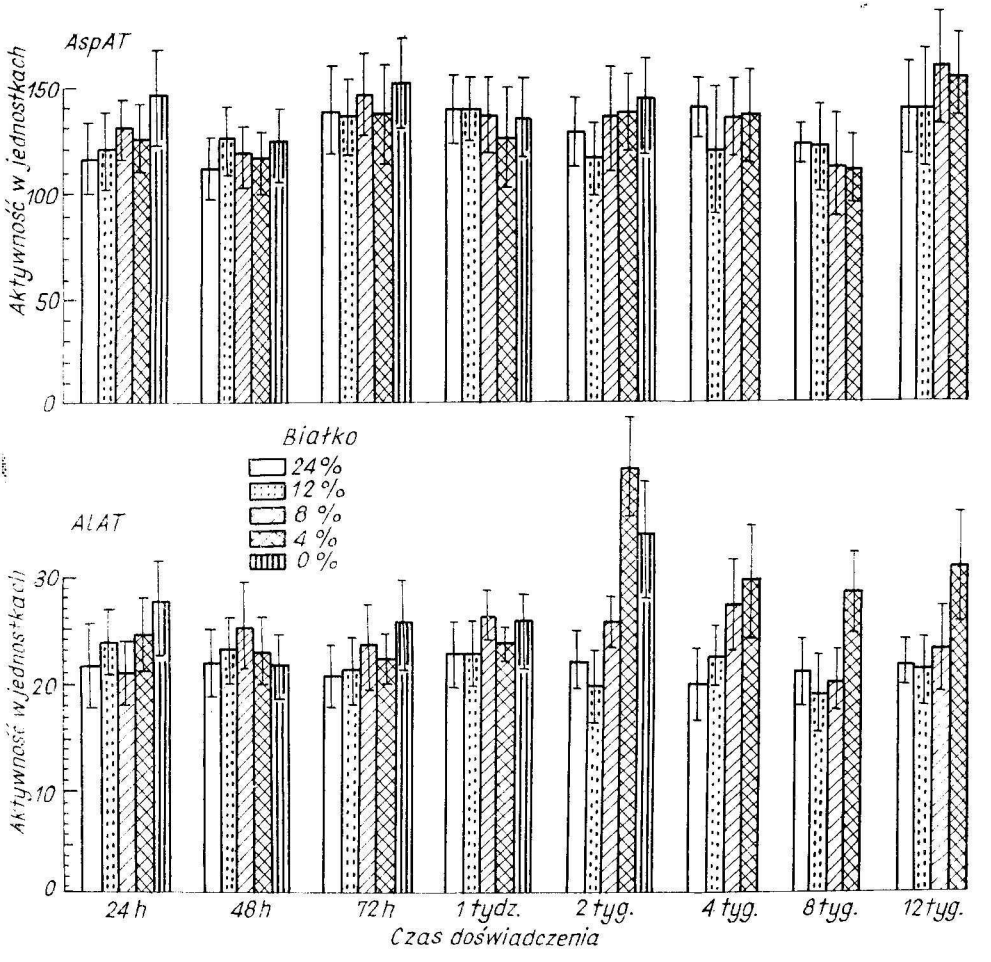
Ryc. 2. Aktywność aldolazy fruktozodwufosforanowej (FDPA) i izomerazy glukozofosforanowej (PHI) w wątrobie szczurów w zależności od poziomu białka w diecie.

czalnego wątroby, poziom białka ogólnego i frakcji białkowych surowicy krwi oraz dane liczbowe i obliczenia statystyczne przedstawiono poprzednio [12].

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Wykazano, że obniżenie poziomu białka w diecie zwierząt powodowało zmniejszenie aktywności aminotransferaz w wątrobie, zaś aktywność enzymów przemiany węglowodanowej albo nie uległa zmianie bądź stwierdzano jej wzrost. Jedynie karmienie dietą bezbiałkową powodowało zmniejszenie aktywności aldolazy fruktozodwufosforanowej.

Z drugiej strony *Blumenthal* i wsp. stwierdzili, że przy ograniczeniu białka w diecie zwierząt aktywność niektórych enzymów tkankowych biorących udział w metabolizmie węglowodanów zwiększa się [3]. Być



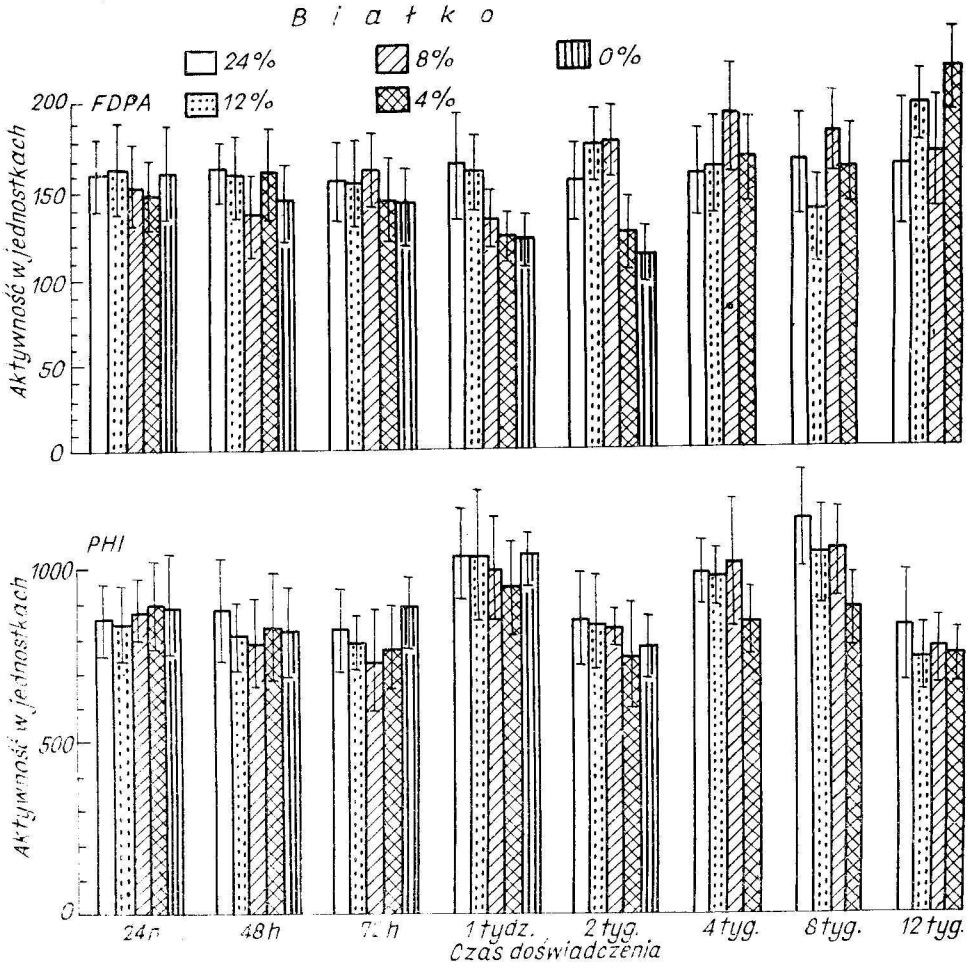
Ryc. 3. Aktywność aminotransferaz: asparaginianowej (AspAT) i alaninowej (AlAT) w surowicy krwi szczurów w zależności od poziomu białka w diecie.

może, rodzaj uzyskanych zmian enzymatycznych zależy od stopnia obniżenia poziomu białka w diecie i czasu jej podawania.

Szepesi i *Freedland* [16] przebadali na szczurach zmiany aktywności kilku enzymów wątrobowych związanych z metabolizmem białek i węglowodanów i wykazali, że aktywność większości z nich była podwyższona po podaniu diety wysokobiałkowej.

Przy małych różnicach poziomu białka w diecie 21—27% *Perez* i wsp. [14] nie obserwowali zmian aktywności PHI w wątrobie.

Poglądy dotyczące zmian aktywności aminotransferaz przy żywieniu deficytowym w białko są kontrowersyjne. *Muramatsu* i *Ashida* [11] stwierdzili, że wraz ze wzrostem zawartości białka w diecie podwyższa się aktywność aminotransferazy asparaginianowej i alaninowej, arginazy i oksydazy ksantynowej oraz zmniejsza się aktywność alkalicznej fosfatazy. *Beaton* i wsp. wskazują na stałe obniżanie aktywności AlAT u szczurów karmionych dietą bezbiałkową. Dla AspAT autorzy nie



Ryc. 4. Aktywność aldolazy fruktozodwufosforanowej (FDPA) i izomerazy glukozofosforanowej (PHI) w surowicy krwi szczurów w zależności od poziomu białka w diecie.

stwierdzili stałej zależności pomiędzy poziomem jej aktywności a zawartością białka w paszy [1]. Podobne wyniki uzyskał *Wells* i wsp. [18]. Wykazali oni, że aktywność AlAT w wątrobie zmniejszyła się przy obniżeniu zawartości białka w diecie, natomiast AspAT nie uległa zmianie. Według *Wirthgena* i *Bergnera* [19] aktywność AspAT i AlAT w wątrobie szczurów karmionych dietą zawierającą 5% białka albo bezbiałkową zmniejsza się. Przy zawartości 10 i 20% białka zwrócono uwagę na bardzo niewielkie zmniejszenie aktywności enzymów bądź nawet tendencje wzrostowe.

Nieco odmienne wyniki uzyskał *Metwalli* [10]. Stwierdził on, że pod wpływem ograniczenia białka w pożywieniu aktywności AspAT i AlAT w wątrobie były wyraźnie podwyższone, przy czym bardziej zwiększyła się aktywność AspAT.

Na podstawie wyników uzyskanych w niniejszym doświadczeniu można przypuszczać, że karmienie zwierząt dietami o obniżonej zawar-

tości białka mogło spowodować zmniejszenie syntezy aminotransferaz w komórkach wątroby. Stąd też obserwowano istotne zmniejszenie aktywności tych enzymów w wątrobie przy nieznacznym tylko zwiększeniu ich poziomu w surowicy, wynikającym prawdopodobnie ze zmienionej przepuszczalności błon komórkowych.

WNIOSKI

1. Niedobory białkowe u szczurów powodują przede wszystkim zmniejszenie aktywności aminotransferazy alaninowej i asparaginianowej w wątrobie.
2. Wielkość zmian aktywności aminotransferaz w wątrobie uzależniona jest od stopnia obniżenia poziomu białka w diecie oraz czasu trwania niedoboru białkowego.
3. Oznaczanie aktywności enzymów przemiany węglowodanowej jest mniej przydatne przy ocenie stanu niedoboru białkowego.
4. Poziom aktywności badanych enzymów w surowicy krwi wydaje się mieć mniejsze znaczenie diagnostyczne w niedożywieniu białkowym.

M. Никоноров, Б. Урбанэк-Карловска, К. Карловски

ВЛИЯНИЕ НЕДОСТАТКА БЕЛКА В КОРМЕ КРЫС НА АКТИВНОСТЬ НЕКОТОРЫХ ФЕРМЕНТОВ БЕЛКОВОГО И УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА

Резюме

Исследовали влияние различного содержания белка в корме крыс (0, 4, 8, 12 и 24%) на активность аланиновой и аспарагиновой аминотрансфераз, а также фруктозодифосфатной алдолазы и глюкозофосфатной изомеразы в сыворотке крови и печени крыс. Определения проводились каждые 24, 48 и 72 часа и каждые 1, 2, 4, 8 и 12 недель.

Установлено, что недостаток белка вызывает в первую очередь уменьшение активности ферментов белкового обмена в печени. Степень изменения исследуемых параметров зависит от степени понижения уровня белка в корме и от времени кормления диетами с пониженным уровнем белка.

M. Nikonorow, B. Urbanek-Karłowska, K. Karłowski

THE EFFECT OF PROTEIN DEFICIENCY IN RATS ON THE ACTIVITY OF SELECTED ENZYMES PARTICIPATING IN PROTEIN AND CARBOHYDRATE METABOLISM

Summary

The effect of feeding of rats on diets containing various levels of protein (0%, 4%, 8%, 12% and 24%) on the activity of alanine and aspartate aminotransferase, fructosediphosphate aldolase and glucose-phosphate isomerase in the serum and liver was investigated.

The determinations were done after 24, 48 and 72 hours and after 1, 2, 4, 8, 12 weeks.

It was found that protein deficiency causes in the first place decreased activity of protein metabolism enzymes in the liver. The degree of changes in these indices depends on the degree of dietary protein content decrease and the duration of protein deficiency.

PIŚMIENNICTWO

1. *Beaton G. H., Curry D. M., Veerri M. J.:* Alanine-glutamic transaminase activity and protein metabolism, Arch. Biochem. Biophys., 1957, 70, 288. — 2. *Bęza R.:* Aminokwasy w żywieniu zwierząt, PWRiL, Warszawa, 1967, 101. — 3. *Blumenthal M. D., Abraham S., Chaikoff I. L.:* Dietary control of liver glucokinase activity in the normal rat, Arch. Biochem. Biophys., 1964, 104, 215. —

4. *Bodansky O.*: Serum phosphohexose izomerase in cancer, Cancer, 1954, 7, 1191. — 5. *Bruns F. H.*: Bestimmung und Eigenschaften der Serum Aldolase, Biochem. Z., 1954, 325, 156. — 6. *Bruns F. H., Puls W.*: Die Aktivität der Serumaldolase bei Erkrankungen der Leber. Ein neuer enzymatischer Test, Klin. Wschr., 1954, 32, 656. — 7. *Freedland R. A.*: Effect of progressive starvation on rat liver enzyme activities, J. Nutr., 1967, 91, 489. — 8. *Jicha J., Jirkalova V., Horak M.*: Prispevek ke stanoveni aminotransferazy aspartatu (GOT) (2.6.1.1.) a alaninu (GPT) (2.6.1.2.), Čas. Lek Cesk., 1966, 105, 883. — 9. *Konieczna W.*: Próby stressowego niedoboru metioniny i cystyny u szczurów dorosłych, Roczn. PZH, 1963, 14, 469. — 10. *Metwalli O. M.*: Studies on tissue transaminases in protein malnutrition, J. Egypt. Med. Ass., 1969, 52, 758.

11. *Muramatsu K., Ashida K.*: Effect of dietary protein level on growth and liver enzyme activities of rats, J. Nutr., 1962, 76, 143. — 12. *Nikonorow M., Urbanek-Karłowska B., Karłowski K.*: Protein-deficient diets. I. Activity of selected enzymes of protein and carbohydrate metabolism, Toxicology, 1973, 1, 263. — 13. *Paget G. E.* ed.: Methods in Toxicology. *Blackwell* Scientific Publications Oxford and Edinburgh, 1970. — 14. *Perez N., Clark-Turri L., Rabaille E., Niemeyer H.*: Regulation of rat liver enzymes by natural components of the diet, J. Biol. Chem., 1964, 239, 2420. — 15. *Reitman S., Fränkel S.*: A colorimetric method for determination of serum glutaminic oxalacetic and glutaminic pyruvic transaminases, Am. J. Clin. Path., 1957, 28, 56. — *Szepesi B., Freedland B. A.*: Alterations in the activities of several rat enzymes at various times after initiation of hight protein regimen, J. Nutr., 1967, 93, 301. — 17. *Urbanek-Karłowska B.*: Wpływ niedoborów białkowych u szczurów na toksyczność kaptanu. Cz. I. Toksyczność ostra kaptanu, Roczn. PZH, 1975, 26, 137. — 18. *Wells I. C., Millar C. K., Mallov S., Zettle M. L.*: Electrophoresis study of the effects of changes in dietary protein and of DL-etionine on the soluble proteins of rat liver, J. Nutr., 1964, 84, 335. — 19. *Wirthgen B., Bergner H.*: Zeitverlauf der Adaptation von GOT, GPT, LAP, OCT und Arginase in der Rattenleber bei quantitativ differenzierter Protein -- ernahrung, Nahrung, 1969, 13, 385.

Dn.: 28.VIII.1976 r.
00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24.