

szczepianiu zaś białek intensywność reakcji rośnie, co może z kolei prowadzić do mylnego wniosku, że poziom wielocukru podnosi się.

Przykładem mogą być wyniki badań Kowarzykowej i wsp. (11) nad zachowaniem się rozkładu glikogenu w sercach zarodków kurzych w hodowli *in vitro*. Za pomocą odczynu PAS liczne były ziarna dające pozytywną reakcję w przedsionkach i komorach. Początkowo wnioskowano, że przedsionki zawierają więcej glikogenu niż komory, a ponieważ w tych ostatnich w miarę postępu rozwoju nasilała się reakcja PAS dodatnia, to można było sądzić, że zwiększyła się synteza wielocukru. Kiedy jednakże oznaczano glikogen całkowity metodą antronomową okazało się, że poziom glikogenu jest zawsze wyższy w komorach niż w przedsionkach. Pozorny wzrost poziomu wielocukru w komorach był spowodowany odszczepianiem się białek.

Innego przykładu pomyłek, wynikających z zastosowania reakcji PAS do histochemicznego śledzenia poziomu glikogenu dostarczają wcześniejsze badania nad zmianami poubojowymi w mięsie zwierząt rzeźnych. Pezacki w roku 1961 podaje, że rozkład glikogenu zachodzi w kilku etapach. Występuje bowiem faza jego spadku, faza poziomu stałego, faza wzrostu i faza nieodwracanego zaniku wielocukru (15). Pozorny wzrost poziomu wielocukru był spowodowany w tym przypadku rozkładem białek kompleksów glikogenowo-białkowych pod wpływem nasilającej się proteolizy.

Dość często w trakcie przygotowywania preparatów histologicznych używa się roztworu alfa-amylazy w celu usunięcia złogów glikogenu. Zabieg ten może nie dać pożądaných efektów w

przypadku większej zawartości białek w kompleksach wielocukru, gdyż alfa-amylaza może ich nie rozkładać do końca, co może być źródłem pomyłek w ocenie stopnia usuwania glikogenu.

Z przedstawionych wyżej przykładów z badań własnych jak i piśmiennictwa wynika, że badania nad połączeniami glikogenu z białkami mają nie tylko znaczenie czysto teoretyczne przy rozważaniach mechanizmów regulacji amylolizy w narządach i tkankach zwierzęcych, lecz również znaczenie metodyczne we wszystkich przypadkach pomiarów aktywności alfa-amylazy wobec glikogenu, szczególnie przy stosowaniu metod pomiarów aktywności enzymu wobec glikogenu, używania enzymu do trawienia glikogenu w preparatach histologicznych i wykrywania w nich wielocukru metodą PAS.

Piśmiennictwo

1. Brzek K., Karpiak S.: Weterynaria, Wrocław 23, 229, 1968.
2. Drocamans P. J.: Ultrastruct. Res. 6, 141, 1962.
3. Godlewski H.: Post. Hig. 40, 155, 1960.
4. Hutny J., Przybylski J., Karpiak S.: Chirurgia Narz. Ruchu 35, 3, 1970.
5. Iwanowski H.: Weterynaria, Wrocław 22, 39, 1967.
6. Iwanowski H.: Arch. Immun. Ther. 16, 116, 1968.
7. Kamp A., Kits van Heinigen A. J.: Biochem. J. 54, 646, 1954.
8. Karpiak S., Kozar Z., Krzyżanowski M.: Wiad. parazyt. 9, 435, 1963.
9. Karpiak S., Iwanowski H.: Arch. Immun. Ther. 13, 368, 1965.
10. Karpiak S., Ziarko D., Zóttowska K., Gwara K.: Arch. Immun. Ther. 225, 199, 1977.
11. Kowarzykowa Z., Zarzycki J., Karpiak S., Kowalewska D., Kochman M., Peryt A., Czechowicz K.: Post. Hig. 17, 689, 1963.
12. Krisman C. R.: Anal. Biochem. 4, 17, 1962.
13. Łomako J.: Acta bioch. pol. 18, 261, 1971.
14. Mejbaum-Katzenellenbogen W., Łomako J.: Acta bioch. pol. 18, 271, 1971.
15. Pezacki W.: Zmiany poubojowe surowców rzeźnych, WPLIS, 1961.
16. Rose J. H., Bailey J. M.: J. biol. Chem. 236, 1244, 1961.
17. Tarmas J.: Arch. Immun. Ther. 10, 881, 1962.

Adres autora: Stanisław E. Karpiak, Zakład Biochemii Instytutu Nauk Fizjologicznych AR, ul. Norwida 31, 50-375 Wrocław.

KRZYSZTOF A. SOBIECH, BOGUSŁAW KOTOŃSKI

Aktywność transglikozylacyjna w narządach szczura w rozwoju ontogenetycznym

Z Zakładu Biochemii Instytutu Nauk Fizjologicznych
Wydziału Weterynaryjnego AR we Wrocławiu

Znany jest fakt, że w czasie ontogenezy maleje intensywność ogólnej przemiany, szczególnie procesów anabolicznych. Obniżenie procesów biosyntezy wiąże się z obniżeniem aktywności odpowiednich enzymów. Nasuwa się też możliwość zmiany funkcji niektórych enzymów zdolnych do katalizowania zarówno procesów syntezy i rozkładu. Przykładem takich enzymów są glikozydazy katalizujące zarówno procesy hydrolizy, jak i transglikozylacji.

Dlatego interesująca wydała się odpowiedź na pytanie, jak zachowują się oba rodzaje wyżej wymienionych aktywności enzymów działających na oligomery glukozy o wiązaniach alfa-1,4-glikozydowych. Brak w piśmiennictwie informacji na ten temat daje się wytłumaczyć trudnościami metodycznymi, polegającymi na odróżnieniu produktów syntezy drogą transglikozy-

lacji od produktów hydrolitycznego rozkładu. Z tego powodu do badań jednoczesnego pomiaru procesów transglikozylacji i hydrolizy użyto p-nitrofenylo-N-maltozydu (pN-/Glc)₂*, który został z powodzeniem zastosowany w naszym laboratorium (3, 4, 5). Za miarę szybkości procesów transglikozylacyjnych przyjęto powstający w reakcji p-nitrofenylo-N-maltotriozyd (pN(Glc)₃), a procesów hydrolizy p-nitrofenylo-N-glukozyd (pN Glc).

W niniejszej pracy przedstawiono wyniki oznaczania obu aktywności w wyciągach z wątroby, nerek i jelit szczurów w rozwoju ontogenetycznym.

* W pracy użyto następujących skrótów: pNGlc — p-nitrofenylo-N-glukozyd, pN(Glc)₂ — p-nitrofenylo-N-maltozyd, pN(Glc)₃ — p-nitrofenylo-N-maltotriozyd.

Materiał i metody

Do badań użyto szczurów rasy Wistar obu płci o wadze około 200 g. Od 9 samic w 16–18 dniu ciąży po dekapitacji uzyskano 38 płodów, z których pobrano badane narządy (nerki, wątroby, jelita). Tkanki płodowe jednego narządu, pochodzące, od jednej matki łączono. Narządy natychmiast po pobraniu przemywano zimnym roztworem soli fizjologicznej i homogenizowano z trzema objętościami zbuforowanego 0,15 M roztworu NaCl o pH 7,4 w temperaturze 2°, a następnie odwirowywano przy 1800 g przez 15 minut w temperaturze 4°. Do dalszych badań używano uzyskany supernatant.

Aktywność transglikozylacyjną oznaczano używając jako substraktu p-nitrofenylo-N-maltozyd (2) i wyrażano w milijednostkach równych liczbie nanomoli p-nitrofenylo-N-maltotriozylu i wyższych N-glikozydów p-nitroanilany, powstających w warunkach metody w czasie 1 minuty przez 1 mg białka (1). Substrat stosowano w stężeniu 40 mM, które było optymalne dla reakcji transglikozylacji. Miarą aktywności hydrolitycznej był przyrost pNGlc, a procentowy udział procesu hydrolizy wyliczano ze wzoru:

$$\%H = \frac{[pNGlc] - [pNGlc]_0}{[pNGlc]} \times 100$$

Reakcję enzymatyczną przerywano przez dodanie dwóch objętości oziębionego 96% alkoholu etylowego i wytrącone białko odwirowywano przy 1800 g przez 15 minut. Produkty reakcji rozdzielano chromatograficznie na bibule Whatman nr 3 w układzie n-propanol: octan etylu:woda (6:1:3) w czasie 16 godzin. Plamy rozdzielonych produktów wykazujące świecenie w UV eluowano wodą i oznaczano ilościowo przy 410 nm. Białko w wyciągach oznaczano metodą Lowry i wsp. (6) używając jako standardu krystalicznej albuminy surowicy bydłej f-my Sigma.

Wyniki i omówienie

Uzyskane wyniki przedstawione w tab. 1 wskazują, że w jelitach i nerkach szczura aktywność hydrolityczna i transglikozylacyjna u osobników dorosłych jest ilościowo wyższa od aktywności w tych samych narządach płodów.

Tab. 1. Aktywność transglikozylacyjna i hydrolityczna w niektórych narządach szczura ($\bar{x} \pm s$)

Narząd	Płody			Osobniki dorosłe		
	H	T	%H	H	T	%H
Jelito	1,08 ± 0,38	0,70 ± 0,26	3,5,2 ± 10,6	2,24 ± 1,05	4,09 ± 0,72	55,7 ± 11,4
Wątroba	0,34 ± 0,14	0,30 ± 0,11	11,8 ± 4,2	0,38 ± 0,07	0,22 ± 0,05	42,1 ± 5,5
Nerka	0,84 ± 0,30	0,79 ± 0,32	5,9 ± 2,0	2,25 ± 0,36	1,30 ± 0,20	42,5 ± 10,2

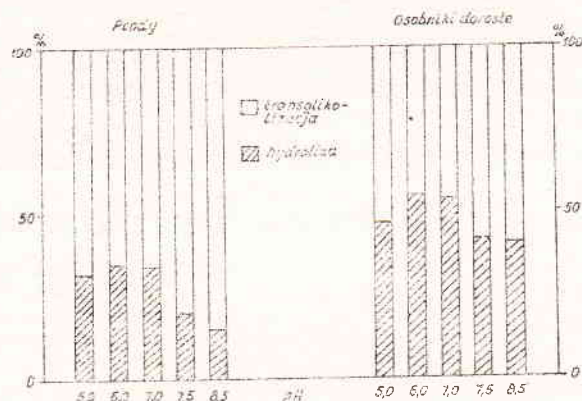
Objaśnienia: H — aktywność hydrolityczna, T — aktywność transglikozylacyjna, %H — procentowy udział procesu hydrolizy.

W jelitach dorosłych aktywność hydrolityczna zwiększa się około 8-krotnie z 1,08 mj do 9 mj, natomiast aktywność transglikozylacyjna około 6-krotnie z 0,7 mj do 4 mj. W nerkach wzrost ten jest mniejszy odpowiednio 2,7-krotnie wzrasta hydroliza, a transglikozylacja 1,6-krotnie. W obu badanych narządach wyraźnie wzrastają procesy hydrolizy niż transglikozylacji. Jeszcze wyraźniej różnice te zaznaczają się w procentowym udziale produktów hydrolizy i transglikozylacji powstających w wyniku wykorzystania przez enzymy zawarte w homogenatach zmodyfikowanej maltozy. W wątrobie wzrost procesów hydrolizy jest nieznaczny, natomiast zmniejsza się aktywność transglikozyla-

cyjna. Zmniejszanie aktywności transglikozylacyjnej powoduje, że wzrasta procentowy udział aktywności hydrolitycznej.

W tkankach płodów stwierdzono największą aktywność hydrolityczną w jelitach, a najmniejszą w wątrobie, natomiast aktywność transglikozylacyjna była największa w nerkach i najmniejsza również w wątrobie. Wszystkie badane tkanki płodów wykazują procentową przewagę procesu transglikozylacji nad procesem hydrolizy użytego substratu. Zdecydowaną przewagę transglikozylacji w granicach 90% sumy powstałych produktów obu reakcji wykazano dla nerek i wątroby, natomiast w jelitach przewaga ta jest mniejsza i wynosi około 65%. Uzyskane wyniki potwierdzają fakt przewagi procesów anabolicznych nad katabolicznymi we wczesnych stadiach ontogenezy.

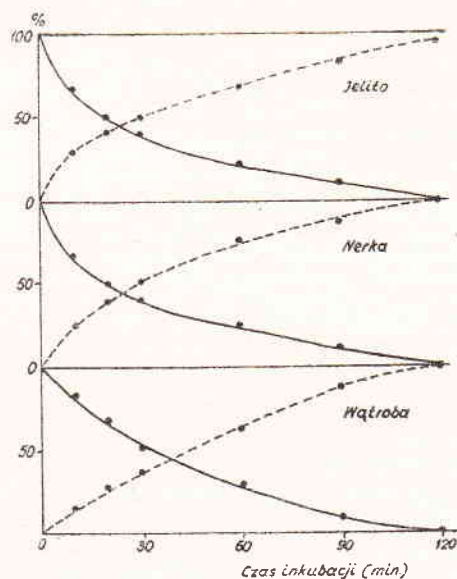
W badanych, analogicznych tkankach osobników dorosłych zaobserwowano przesunięcie wykorzystania zastosowanego substratu w kierunku rozkładu. W jelitach szczurów dorosłych p-nitrofenylo-N-maltozyd był w nieco większym stopniu hydrolizowany do p-nitrofenylo-N-glukozydu i glukozy niż wykorzystany do niefosforylacyjnej syntezy oligosacharydów. W wątrobie i nerkach tych zwierząt stwierdzono znaczny, procentowy wzrost udziału procesów hydrolizy w porównaniu do tych samych narządów płodów. W tych narządach zwierząt dorosłych procentowy udział obu badanych procesów jest do siebie zbliżony. Względny stosunek aktywności w jelicie, nerce i wątrobie dla hydrolizy wynosi odpowiednio jak 24:6:1, a dla transglikozylacji jak 18:6:1, co świadczy o znacznych różnicach pomiędzy tymi narządami u osobników dorosłych. Mniej wyraźnie różnice te występują w narządach płodów.



Ryc. 1. Niefosforylacyjna transglikozylacja i hydroliza w jelicie szczurów w zależności od pH

Z uwagi na fakt, że najwyższą aktywność obu badanych procesów wykazano w jelicie osobników dorosłych, przebadano także ich zachowanie w zależności od pH (ryc. 1). Procentowy udział hydrolizy badanego substraktu u płodów i osobników dorosłych jest najwyższy w pH 6,0 — 7,0 a następnie wyraźnie zmniejsza się. Aktywność hydrolityczna homogenatów jelita osobników dorosłych niezależnie od pH jest wyższa od aktywności w jelicie płodów. Różnice te zaznaczają się szczególnie w pH powyżej 7,0.

Przebieg enzymatycznej hydrolizy pN(Glc)₂ w czasie przedstawia ryc. 2A. Zbliżoną aktywność hydrolityczną homogenatów z trzech badanych narządów osiągnięto stosując w doświadczeniu odpowiednio dobrane ich objętości. Zaobserwowano, że połowiczny zanik substratu dla jelita i nerki był jednakowy i wystąpił po 20 minutach inkubacji, natomiast w wątrobie po 30 minutach.



A. ——— p-nitrofenylo-N-glukozyd
———— p-nitrofenylo-N-maltozyd

Na ryc. 2B przedstawiono przyrost produktów transglukozytacji, które powstają w czasie rozkładu substratu ($pN(Glc)_2$) przez homogenaty tkankowe. Procentowy udział tych produktów osiąga największą wartość w nerkach, następnie w jelitach i wątrobie.

Maksymalny przyrost $pN(Glc)_3$ w zależności od użytego homogenatu obserwowano w różnym czasie inkubacji. W wątrobie osiągnięty został po 10 minutach, w jelicie po 20 minutach, a w nerce po 30 minutach inkubacji. Stwierdzono również pojawienie się $pN(Glc)_4$ — pochodnej maltotetraozy — w nerce i jelicie, przy czym maksymalny przyrost w obu wypadkach wystąpił po 45 minutach inkubacji. Po osiągnięciu maksymalnych wartości przyrostu $pN(Glc)_3$ i $pN(Glc)_4$ obserwowano powolny spadek ich stężenia w czasie, co można tłumaczyć z jednej strony własnościami akceptorowymi przenoszonej reszty glukozylowej przez $pN(Glc)_3$ z utworzeniem $pN(Glc)_4$, a z drugiej powolną hydrolizą tych oligosacharydów, zwłaszcza, że jak wynika z ryc. 2A dość szybko spada stężenie substratu — $pN(Glc)_2$.

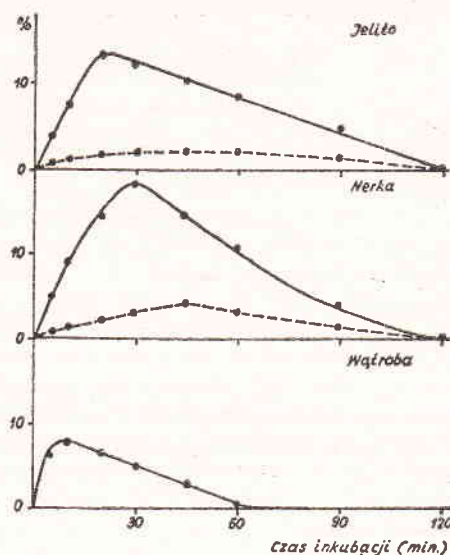
Badane procesy niefosforylacyjnej transglukozytacji łącznie z aktywnością hydrolityczną (α -1-4-glukozydazową) u płodów i osobników dorosłych potwierdziły procentową przewagę procesów syntezy oligosacharydów nad ich hydrolizą w trzech wybranych narządach we wcześniejszym etapie ontogenezy. U osobników dorosłych, obok wzrostu aktywności, procentowe stosunki pomiędzy syntezą a rozkładem oligosacharydów uległy zmianie na korzyść procesów hydrolizy.

Wnioski

1. W wyniku inkubacji $pN(Glc)_2$ z homogenatami wątroby, nerki i jelita szczura stwierdzono obecność wyższych N-glikozydów p-nitroaniliny — produktów niefosforylacyjnej transglukozytacji



2. W narządach płodów, w odróżnieniu od osobników dorosłych, procentowy udział procesu transglukozytacji jest wyższy niż procesu hydrolizy, co wiąże się z przewagą procesów anabolicznych w rozwijającym się organizmie.



B. ——— p-nitrofenylo-N-maltotriozyd
———— p-nitrofenylo-N-maltotetraozyd

3. Występują znaczne różnice w aktywności transglukozylacyjnej w badanych narządach, które pogłębiają się w rozwoju ontogenetycznym.

Piśmiennictwo

1. Hutny J., Kossobudzki L.: Arch. Immun. Ther. 16, 870, 1968.
2. Kossobudzki L.: Arch. Immun. Ther. 156 902, 197.
3. Kossobudzki L.: Arch. Immun. Ther. 24, 935, 1976.
4. Kotoński B.: Pol. Arch. wet. (w druku).
5. Kotoński B., Sobiech K. A.: Pol. Arch. wet. (w druku).
6. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. R.: J. biol. Chem. 193, 265, 1951.

Adres autora: Krzysztof A. Sobiech, ul Norwida 31, 50-375 Wrocław, Zakład Biochemii Inst. Nauk Fizjologicznych AR.

Собех К. А., Котонский В. — Трансглюкозиляционная активность в органах крысы в онтогенетическом развитии.

Применяя в качестве субстрата р-нитрофенил-N-мальтозид, определяли трансглюкозиляционную активность в кишке, почке и печени крыс с онтогенетическим развитием. Мерой трансглюкозиляционной активности приняли образующийся в реакции р-нитрофенил-N-мальтотриозид, а гидролитической активности — р-нитрофенил-N-глюкозид. Наивысшую трансглюкозиляционную активность отметили у плодов в почке, у зрелых же особей — в кишке.

Показали, что у зрелых особей соотношение трансглюкозиляционной активности в кишке, почке и печени составляет соответственно 18:6:1. Полученные результаты подтверждают факт преобладания анаболических процессов над катаболическими в ранних стадиях онтогенеза.

Sobiech K. A., Kotoński B. — Transglucosylative activity in the organs of the rat in ontogenesis.

Using p-nitrophenyl-N-maltoside as a substrate the authors determined transglucosylative activity in the intestines, kidney and liver of rats in the process of ontogenesis. As a measure of transglucosylative activity was chosen p-nitrophenyl-N-maltotrioxide, and hydrolytic activity p-nitrophenyl-N-glucoside, which were liberated in the course of the reaction. The highest transglucosylative activity in embryos possessed kidneys, in adults intestines.

It was found that in adult rats the relative proportions of the transglucosylative activity in intestines, kidney and liver are 18:6:1. The obtained results confirm the statement of domination of anabolic processes over catabolic one in early stages of ontogenesis.