

Katedra i Zakład Patologii Ogólnej i Doświadczalnej. Wydział Lekarski.
Akademia Medyczna w Lublinie
Kierownik: prof. dr Jarosław Billewicz-Stankiewicz

Jarosław BILLEWICZ-STANKIEWICZ
Wiesław GOŁĄBEK i Anna PLANDA

**O zmianach aktywności adrenalinooksydaz osocza w okresie
wzrostu zwierząt**

**Об изменении активности адреналинооксидаз плазмы крови
во время роста животных**

**Über die Veränderungen der Adrenalin-Oxydasen-Aktivität
des Blutplasmas in der Wachstumsperiode der Tiere**

Celem naszej pracy było stwierdzenie, czy i jak się zmienia aktywność adrenalinooksydaz osocza krwi w okresie wzrostu zwierząt. Pod mianem „adrenalinooksydazy” (AdO) rozumiemy zespół enzymów zawartych w osoczu, które katalizują utlenianie adrenaliny. W przeciwieństwie do utleniania adrenaliny w tkankach, gdzie główną rolę odgrywają monoaminooksydaza i o-metylotransferaza, utlenianie adrenaliny w osoczu katalizowane jest przez polifenolooksydazy, do których można zaliczyć ceruloplazminę (5) i inne mniej zdefiniowane enzymy. Udział oksydazy cytochromowej, katalazy i peroksydazy w utlenianiu adrenaliny w osoczu nie zdaje się być istotny (4). Należy dodać, że w pracy niniejszej interesował nas globalny enzymatyczny rozkład adrenaliny przez osocze, a nie ścisła identyfikacja enzymów biorących w tym udział, co jest przedmiotem naszych osobnych badań.

METODYKA I MATERIAŁ DOŚWIADCZALNY

Aktywność enzymatyczną osocza w okresie wzrostu oznaczaliśmy u białych szczurów, u kurcząt oraz u żab, a więc u przedstawicieli trzech gromad z systematyki świata zwierzęcego: ssaków, ptaków i płazów. Aktywność adrenalinooksydaz oznaczana była mikrometodą Jasińskiego i Tyburczyka (4) w sposób następujący. Do próbki wirówkowej o pojemności 10 ml odpipetowuje się 6 ml buforu fosforanowego izotonicznego o pH — 6,00 przygotowanego z 3,8 ml 0,164 mol. roztworu NaH_2PO_4 i 96,2 ml. 0,630 mol. roztworu NaOH . Do buforu daje się 0,06 ml pełnej krwi. Zawartość próbki wiruje się przez 5 min. przy

3000 obr./min. Bufor z osoczem oddziela się od krwinek przez dekantację. Do dwóch probówek A i B odpipetowuje się kolejno:

	A	B
Bufor z osoczem	2,0 ml	2,0 ml
Bufor fosforanowy o pH — 6,00	0,3 ml	0,2 ml
4% roztwór wersenianu sodu	0,1 ml	0,1 ml
10 mg% roztwór cyjanku potasu	0,1 ml	0,1 ml
50 mg% roztwór adrenaliny	0,1 ml	0,1 ml
3% roztwór nadtlenu wodoru (woda utleniona)	2 krople	2 krople

Zawartość obu probówek wstrząsa się i inkubuje w ultratermostacie Höpplera w temperaturze 37°C przez 30 minut. Po inkubacji do probówki B dodaje się 0,1 ml 0,25 % roztworu żelazicyjanku potasu, a po 5 minutach dodaje się do probówek A i B po 0,1 ml 0,5N HCl. Zawartość probówki B rozcieńcza się w stosunku 1:1 buforem fosforanowym o pH — 6,00. Oba roztwory bada się fotometrycznie na fotometrze Pulfricha w mikrokuwetach o grubości warstwy 5 cm i pojemności 1 ml przy użyciu filtru o maksymalnej absorpcji 500 m μ wobec buforu. Aktywność AdO oblicza się ze wzoru:

$$(\text{Ext}_A \cdot f + 50 - 2\text{Ext}_B \cdot f) \cdot 1,09 = \text{Liczba } \mu \text{ mol rozłożonej adrenaliny/1 ml osocza/60 min. w temp. 37°C}$$

$$\text{Ext}_A = \text{ekstynkacja próbki A, Ext}_B = \text{ekstynkacja próbki B,}$$

$$f = \text{współczynnik kalibracji.}$$

Oznaczanie współczynnika kalibracji. Po przygotowaniu standardowego roztworu adrenaliny (50 mg adrenaliny rozpuszcza się w 10 ml 0,5N HCl i uzupełnia się wodą destylowaną do 100 ml) odpipetowuje się do dwóch probówek A i B:

	A	B
Bufor fosforanowy o pH — 6,00	2,5 ml	2,4 ml
Roztwór standardowy adrenaliny	—	0,1 ml
3% roztwór nadtlenu wodoru	2 krople	2 krople
0,25 % roztwór żelazicyjanku potasu	0,1 ml	0,1 ml

Po 5 minutach dodaje się do obu probówek po 0,1 ml 0,5N HCl. Probkę B rozcieńcza się buforem fosforanowym o pH — 6,00 w stosunku 1:1 i fotometruje oba roztwory na fotometrze Pulfricha w mikrokuwetach 5 cm przy użyciu filtru o maksymalnej absorpcji 500 m μ wobec buforu. Współczynnik oblicza się według wzoru:

$$f = 50(2\text{Ext}_B - 0,5\text{Ext}_A)$$

Wartości średnie porównywane były z odpowiednimi średnimi grup wyjściowych, tzn. zwierząt najmłodszych przy pomocy ogólnie znanych testów znamienności dla tzw. małej próby.

BADANIA WŁASNE

A. Pomiary na białych szczurach wykonaliśmy u 64 zwierząt. U 44 zwierząt w wieku 5—20 dni krew pobieraliśmy przez przecięcie tętnic szyjnych, natomiast u 20 starszych z naczyń ogona, tak że nie zachodziła konieczność zabijania tych zwierząt. Dzięki temu te same osobniki służyły nam do dalszych pomiarów, stanowiąc jedno-

częśnie grupę badaną i kontrolną. W wieku 5—8 dni średnia aktywność AdO jest mała i nieco przekracza 50 % wartości, którą stwierdza się u zwierząt dojrzałych. Średnia aktywność u tych ostatnich wynosi 11,92 (uzyskana z pomiarów na 140 osobnikach). Szybki wzrost aktywności zachodzi w pierwszych czterech tygodniach osiągając w 30 dniu życia wartości bardzo zbliżone do tych, które widzimy u zwierząt dojrzałych. Dalsze zwiększanie aktywności jest powolne i nieznaczne. Wyniki pomiarów są przedstawione w tabeli 1.

Tab. 1. Zmiany aktywności adrenalinoooksydaz osocza krwi w okresie wzrostu u białych szczurów

Die Veränderungen der Adrenalin-Oxydasen-Aktivität des Blutplasmas in der Wachstumsperiode der weissen Ratten

Wiek	\bar{x}	$S\bar{x}$	t	P	n
5 dni	6,72	0,5651			8
8 dni	7,34	0,5492	0,781	< 0,5	6
10 dni	9,22	0,5226	3,38	< 0,01	20
20 dni	8,95	0,6676	2,55	< 0,05	10
30 dni	11,96	0,3941	7,69	< 0,001	10
40 dni	12,13	0,4005	7,81	< 0,001	10
50 dni	12,57	0,3582	8,71	< 0,001	10
60 dni	12,70	0,2783	9,51	< 0,001	20

Objaśnienia: \bar{x} — średnia aktywność enzymatyczna w $\mu\text{mol/l}$ ml osocza/60 min. w 37°C, $S\bar{x}$ — błąd standardowy średniej, t — sprawdzian znamienności „t”, P — ryzyko błędu, n — liczebność pomiarów.

B. W pomiarach na żabach posługiwaliśmy się żabą płową (*Rana temporaria*). Oznaczanie aktywności enzymatycznej wykonaliśmy u 60 zwierząt, przy czym krew pobierana była z naczyń szyi po dekapitacji. Ponieważ ściśle określenie wieku żab nie było możliwe, zwierzęta podzieliliśmy na grupy według długości ciała, gdyż im zwierzę jest starsze tym jest większe. Miernikiem wielkości osobnika była długość odcinka, mierzonego od nozdrzy do końca kości ogonowej. Zwierzę dojrzałe ma 8—10 cm długości i żyje do 10 lat(1). Jak wynika z danych tabeli 2, w miarę zwiększania się wymiarów żaby średnia aktywność AdO wzrastała w sposób statystycznie znamienny. Gradient wzrostu aktywności nie jest tak duży jak u szczurów, być może także dlatego, że długość ciała jest pośrednim i nie w tym stopniu dokładnym miernikiem wieku co czas. Ponadto badane żaby, jak wynika z ich wymiarów, znajdowały się najprawdopodobniej w drugiej połowie okresu wzrostowego, w której wzmaganie się aktywności enzymatycznej przypuszczalnie nie jest już tak intensywne.

Tab. 2. Zmiany aktywności adrenalinoooksydaz osocza krwi w okresie wzrostu u żab
Die Veränderungen der Adrenalin-Oxydasen-Aktivität des Blutplasmas in der
Wuchsperiode der Frösche

Długość ciała w cm	\bar{x}	$S\bar{x}$	t	P	n
3,0—4,0	7,88	0,4509			10
5,0—6,0	8,97	0,2167	2,24	< 0,05	20
6,5—7,0	9,63	0,3433	3,17	< 0,01	10
7,5—8,0	9,82	0,2566	3,81	< 0,01	20

Oznaczenia jak w tab. 1.

Tab. 3. Aktywność adrenalinoooksydaz osocza krwi w okresie wzrostu u kur
Adrenalin-Oxydasen-Aktivität des Blutplasmas der Hühner

Wiek	\bar{x}	n	Wiek	\bar{x}	n
1 dzień	7,12	10	14 tygodni	7,24	10
3 dni	6,76	10	15 tygodni	8,23	10
1 tydzień	6,36	10	16 tygodni	7,09	10
2 tygodnie	6,43	10	17 tygodni	6,83	10
3 tygodnie	7,94	10	18 tygodni	6,87	10
4 tygodnie	7,62	10	19 tygodni	7,05	10
5 tygodni	7,48	10	20 tygodni	7,04	10
6 tygodni	7,39	10	21 tygodni	6,85	10
7 tygodni	7,35	10	23 tygodnie	6,93	10
8 tygodni	9,43	10	24 tygodnie	7,09	10
9 tygodni	8,14	10	25 tygodni	7,69	10
10 tygodni	7,06	10	26 tygodni	7,12	10
11 tygodni	7,28	10	27 tygodni	7,35	10
12 tygodni	7,28	10	28 tygodni	7,18	10
13 tygodni	7,22	10	29 tygodni	7,39	10

Oznaczenia jak w tab. 1.

C. Oznaczanie aktywności AdO u kurcząt i młodych kur przeprowadziliśmy na 50 osobnikach. Pomiary wykonywaliśmy w pierwszym i trzecim dniu życia i w wieku 1 tygodnia, a następnie co tydzień aż do 29 tygodni. W pierwszych trzech seriach pomiarów, tzn. do 1 tygodnia włącznie krew pobieraliśmy przez dekapitację. Od wieku 2 tygodni możliwe już było pobieranie krwi z naczyń skrzydła, tak że wyniki uzyskane począwszy od tego czasu pochodzą od tych samych osobników w ilości 20 sztuk. Osobniki te podzieliliśmy na dwie grupy po 10 sztuk, przy czym aktywność enzymatyczna oznaczana była w każdej grupie w odstępach dwutygodniowych. Jak wynika z danych w tabeli 3, aktywność AdO u kur od chwili wyklucia

się z jajka do wieku 7 miesięcy podlega pewnym nieregularnym wahaniom, utrzymując się jednak mniej więcej na tym samym średnim poziomie.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Zachowanie się aktywności różnych enzymów w zależności od wieku było przedmiotem badań, które są jednak stosunkowo nieliczne. Jesteśmy jeszcze dalecy od poznania jak się przedstawia zmienność całości obrazu enzymatycznego w okresie rozwojowym. Tym niemniej z wyników dotychczas ogłoszonych można wnioskować, że większość enzymów właściwych ustrojowi dojrzałemu jest obecna już w ustroju noworodka, chociaż aktywność ich jest przeważnie nieznaczna. Sama jednak obecność tych enzymów świadczy, że droga syntezy poszczególnych białek zostaje przetworzona już w życiu płodowym (5). W wątrobie noworodków ludzkich i zwierzęcych szczególnie mała jest aktywność adenozyntrójfosfatazy, oksydazy d-aminokwasowej, oksydaz cholinowej i cytochromowej, zaś zupełnie jest brak oksydazy ksantynowej. Podobnie zachowuje się u noworodków aktywność szeregu enzymów w przewodzie pokarmowym (5).

Nasze wyniki, uzyskane z pomiarów na szczurach i żabach wskazują na to, że aktywność adrenalinoooksydaz osocza jest stosunkowo mała w chwili urodzenia i wzrasta stopniowo wraz z wiekiem, co jest zgodne z danymi dotyczącymi niektórych innych enzymów, jak to zostało przedstawione wyżej. Z innej naszej pracy można wnioskować, że adrenalinoooksydazy osocza są najprawdopodobniej pochodzenia wątrobowego (2). Dlatego stopniowy wzrost aktywności enzymatycznej AdO zdaje się wskazywać na zwiększającą się wraz ze wzrostem ustroju sprawność syntezy tych enzymów w wątrobie. Wyniki z pomiarów uzyskane u kurcząt zasługują na podkreślenie, gdyż świadczą, że już w końcowym okresie życia płodowego kury koncentracja adrenalinoooksydaz w osoczu krwi osiąga poziom właściwy osobnikom dorosłym.

WNIOSKI

Pomiary wykonane u białych szczurów i żab wykazały, że aktywność adrenalinoooksydaz osocza u zwierząt młodych jest niska i wzrasta stopniowo w sposób statystycznie znamieny w okresie wzrostu, dochodząc do wartości maksymalnych u zwierząt dojrzałych. Natomiast badania przeprowadzone na kurczętach i młodych kurach wskazują na to, że w chwili urodzenia aktywność enzymatyczna nie różni się zasadniczo od aktywności oksydaz osobników dojrzałych.

PIŚMIENICTWO

1. Adolph W.: Żaba. Monografia zootomiczna, PZWS, Warszawa 1950.
2. Billewicz-Stankiewicz J., Tyburczyk W.: Praca przygotowana do druku.
3. Gryglewski R.: Post. Hig. Med. Dośw. **14**, 337—372, 1960.
4. Jasiński A., Tyburczyk W.: Acta Physiol. Polon. **12**, 887—900, 1961.
5. Richterich R.: Enzymopathologie. Enzyme in Klinik und Forschung. Springer. Berlin, Göttingen, Heidelberg 1958, str. 67.

РЕЗЮМЕ

Авторами были проведены измерения активности адреналинооксидаз плазмы крови у 64 белых крыс, у 60 лягушек и у 50 цыплят и молодых кур. Энзиматическая активность обозначалась при помощи микрометода, в котором в качестве донатора кислорода применялась перекись водорода.

Исследования показали, что у белых крыс и у лягушек энзиматическая активность сначала низкая, потом по мере роста животных, подвергается постепенному, статистически достоверному увеличению. Энзиматическая активность плазмы цыплят и кур до семимесячного возраста удерживается на том же самом среднем уровне. Это указывает на то, что активность адреналинооксидаз плазмы у кур во время их рождения не отличается в основном от активности оксидаз зрелых особей.

Табл. 1. Изменения активности адреналинооксидаз плазмы крови во время роста белых крыс.

Табл. 2. Изменения активности адреналинооксидаз плазмы крови во время роста лягушек.

Табл. 3. Активность адреналинооксидаз плазмы крови во время роста кур.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Verfasser führten die Adrenalin-Oxydasen-Aktivitätsbestimmungen des Blutplasmas an 64 weissen Ratten, an 60 Fröschen und an 50 Hühnchen und jungen Hühnern durch. Die Enzymaktivität wurde mit einer Mikromethode bestimmt, in der Wasserstoffperoxyd als Sauerstoffdonator gebraucht wurde.

Die Untersuchungen zeigen, dass die Adrenalin-Oxydasen-Aktivität bei weissen Ratten und Fröschen anfangs niedrig ist und dann steigt

während des Wuchses allmählich an. Die Steigerung ist statistisch signifikant. Bei Hühnchen und Hühnern bleibt die Enzymaktivität auf demselben mittleren Niveau. Wir haben die Messungen bis zum 7 Lebensmonat verfolgt. Daraus kann man schliessen, dass kein wesentlicher Unterschied zwischen Adrenalin-Oxydasen-Aktivität bei neugeborenen Hühnchen und erwachsenen Individuen besteht.

Pracę otrzymano 13 IV 1964.

