

Instytut Nauk Fizjologicznych Wydziału Weterynaryjnego AR w Lublinie

Tadeusz MIERZEJEWSKI,
Barbara JĘDRZEJEWSKA

**Aktywność aminotransferaz: 1-asparaginian: 2-oksoglutaran (AspAT)
E.C.2.6.1.1 i 1-alanina: 2-oksoglutaran (AlAT) E.C.2.6.1.2
w bezkomórkowych wyciągach homogenatów błon wewnętrznych
i środkowych tętnic głównych świń bez zmian i ze zmianami
arteriosklerotycznymi**

Активность глутаматаспартаттрансаминазы 2.6.1.1. (AspAT) и глутаматаланин-трансаминазы (AlAT) 2.6.1.2. в гомогенатах интимальной и медиальной аорты с артеросклеротическими изменениями и без изменений

Activity of the 1-Aspartate 2-oxoglutarate aminotransferase (AspAT) E.C.2.6.1.1. and of the 1-Alanine 2-oxoglutarate aminotransferase (AlAT) E.C.2.6.1.2. in Cell-Free Extracts of the Intima and of the Media Homogenates from Pigs Aortas without, and with, Arteriosclerotic Lesions

Miażdżyca u człowieka i arterioskleroza u zwierząt są ogólnoustrojowymi chorobami tętnic. Zmiany patologiczne prowadzące do proliferacji i zwyrodnienia toczą się w środkowej i wewnętrznej błonie naczynia. Patogeneza tych zmian nie jest w zasadzie znana. Pogląd, że hiperlipemia prowadzi z czasem do miejscowych zmian zwyrodnieniowych w ścianach naczyń tętniczych, poparto doświadczeniami. Przyjmuje się też teorię zakrzepowego pochodzenia zmian miażdżycowych (6). Wyniki biochemicznych badań laboratoryjnych wskazują przede wszystkim na zaburzenia przemiany lipidów (5—8, 11—13, 15—17, 20—21) i procesów krzepnięcia krwi oraz na wtórne uszkodzenie wątroby, ogólnoustrojowe zaburzenia metaboliczne i wzmożony rozpad tkanek (6). Badania histochemiczne enzymów w tętnicach u człowieka i u zwierząt wykazały, że w naczyniach ze zmianami arteriosklerotycznymi pewne enzymy wydają się pozostawać bez zmian, podczas gdy inne pojawiają się w zwiększonych lub zmniejszonych ilościach (8). Dlatego aktywność enzymów w ścianie tętnicy głównej i we krwi jest ostatnio przedmiotem dużego zainteresowania i licznych prac, w przypadkach hiperlipemii oraz naturalnej i doświadczalnie wywołanej arteriosklerozy (1—4, 7—17, 19—21). W błonach wewnętrznych i środkowych aort świń pomiędzy grupami ze zmianami arteriosklerotycznymi

nymi i bez takich zmian wykazano statystycznie istotne różnice w aktywności enzymów proteolitycznych i lipazy trójglicerydowej (13—14). W doświadczalnej arteriosklerozie u szczurów i królików zaburzenia w aktywności enzymów lipolitycznych, a mianowicie spadek aktywności esterazy cholesterolowej oraz wzrost lipazy i fosfolipazy A, wyprzedzały wystąpienie zmian proliferacyjno-zwyrodnieniowych w błonie wewnętrznej tętnicy (15—17).

Badania nad aktywnością AspAT i AlAT w układzie krążenia somatycznego wykazały, że u ludzi istnieje współzależność pomiędzy poziomem trójglicerydów we krwi a aktywnością AlAT (4). U kogutów skarmianych dietą aterogenną ma miejsce zaburzenie aktywności AspAT i AlAT w osoczu (9, 10), a w miażdżycy u człowieka wzrasta aktywność AspAT w surowicy krwi (3).

W badaniach porównawczych nad miażdżycą właściwy model badawczy stanowią świnię, ponieważ u tych zwierząt występuje w dużym odsetku naturalna arterioskleroza. W niniejszej pracy podjęto badania, których celem było ustalenie, czy u świń w tętnicach głównych ze zmianami arteriosklerotycznymi dochodzi do istotnych zaburzeń w aktywności AlAT i AspAT.

MATERIAŁ I METODY

Materiał do badań pobierano od świń rasy białej polskiej o ciężarze około 100 kg. Natychmiast po uboju izolowano odcinki piersiowe i brzuszne aort, przeemywano chłodną wodą (+7°C), rozcinano i osuszano bibułą filtracyjną. Spośród kilkudziesięciu izolowanych aort wybrano 14 z makroskopowo wyraźnymi zmianami arteriosklerotycznymi — grupa A oraz 14, w których nie stwierdzono zmian — grupa Bz. Na pewnej przestrzeni odcinka piersiowego i brzuszego zdejmowano błonę wewnętrzną wraz z częścią środkową i zamrażano przy pomocy dwutlenku węgla. Weryfikację oceny makroskopowej przeprowadzono histopatologicznie w Zakładzie Fizjopatologii Instytutu Nauk Fizjologicznych Akademii Rolniczej w Lublinie wg opisanych uprzednio metod (5).

Zamrożone błony grup Bz i A rozdrabniano skalpelem w zimnych, umieszczonych w lodzie moździerzach, a następnie ucierano z pyłem szklanym na miazgę, dodając równymi porcjami zimny (0°C) 30% roztwór glicerolu w wodzie w stosunku 5 ml 30% glicerolu na 1 g tkanki. Homogenat wirowano w chłodni w temperaturze +2°C, przy 10 000 obrotów/minutę przez 15 minut (13, 14). Supernatant — bezkomórkowy wyciąg użyto do oznaczeń aktywności aminotransferaz: l-asparaginian: 2-oksoglutaran (AspAT) E.C.2.6.1.1 i l-alanina: 2-oksoglutaran (AlAT) E.C.2.6.1.2.

Oznaczenia aktywności enzymów przeprowadzono w oparciu o metodę Reitmana i Frankela (18) w fotokolorymetrze firmy Specol przy długości fali 490 nm w kiuwetach o drodze świetlnej 1 cm. Z krzywej standardowej odczytano ilość mikromoli pirogronianu w próbie. Za jednostkę AspAT i AlAT (J) przyjęto 1 mikromol pirogronianu uwolnionego w czasie 1 minuty w temperaturze 37°C, z mieszaniny reagującej o składzie reaktantów ustalonym przez autorów metody. Aktywność specyficzną AspAT i AlAT wyrażano w mJ/mg białka. W przypadkach AspAT bezkomórkowy ekstrakt rozcieńczano dziesięciokrotnie, ponieważ próby z nierozcieńczonym wyciągiem dawały wartości przekraczające optymalne warunki oznaczeń podane przez autorów. Następnie wyniki pomnożono przez 10. Każde oznaczenie przeprowadzano trzykrotnie. Wyniki stanowią średnią arytmetyczną oznaczeń. Białko oznaczano metodą Lovry'ego. Odczynniki zastosowano c.z.d.a.

WYNIKI I OMÓWIENIE

Wyniki oznaczeń zebrano w tab. 1. Konfrontację aktywności AspAT i AlAT w wyciągach A i Bz przeprowadzono testem równości średnich dwóch populacji normalnych. W tym celu wykonano dwukrotnie obliczenia statystyczne posługując się wzorem:

$$V_{1/2} = \sqrt{\frac{\frac{\bar{Bz} - \bar{A}}{S^2 Bz - S^2 A}}{n}}$$

$V_1 = 0,002$ dla AlAT

$V_2 = 0,01$ dla AspAT

Badania niniejsze wykazały, że w bezkomórkowych wyciągach błon wewnętrznych i środkowych tętnic głównych świń w grupach A i Bz występowały enzymy katalizujące reakcję aminotransferazową AspAT i AlAT. Aktywność specyficzna AspAT w grupie A i grupie Bz była średnio 25-krotnie wyższa od aktywności specyficznej AlAT. Analiza statystyczna wyników przedstawionych w tab. 1 informuje, że w błonach wewnętrznych tętnic głównych ze zmianami arteriosklerotycznymi nie ma miejsca ani indukcja, ani depresja lub represja aktywności tych aminotransferaz. Odczytane z tablic Zielińskiego (22) na poziomie

Tab. 1. Aktywność specyficzna AlAT i AspAT w grupach A i Bz (warunki reakcji wg opisu podanego w metodach)

Specific activity of the AlAT and of the AspAT in A and Bz groups (conditions of the reaction as described in methods)

Lp.	Grupa A		Lp.	Grupa Bz	
	aktywność mJ/mg białka AlAT	AspAT		aktywność mJ/mg białka AlAT	AspAT
1	1,481	30,925	1	1,111	23,263
2	2,032	44,892	2	2,439	24,390
3	1,397	49,462	3	1,851	49,145
4	1,180	18,750	4	1,875	34,615
5	1,092	17,759	5	1,219	34,709
6	1,393	19,696	6	1,120	22,448
7	1,290	25,806	7	1,125	31,531
8	0,747	27,011	8	1,092	26,639
9	0,772	18,357	9	0,476	22,023
10	0,619	21,428	10	0,597	23,009
11	0,541	11,250	11	0,638	20,833
12	0,921	14,893	12	0,561	13,480
13	0,722	24,444	13	0,542	21,317
14	1,200	45,333	14	0,733	22,050
$\bar{x}$	1,099	26,429	$\bar{x}$	1,098	26,389
S	0,336	5,141	S	0,570	8,379

istotności $\alpha=0,05$ przy 13 stopniach swobody wartości krytyczne statystyk V_1 i V_2 dały w obu przypadkach niską wartość testu. Świadczy to o braku istotnych różnic w aktywności aminotransferaz AlAT i AspAT między grupami A i Bz. W związku z tym można przypuszczać, że zaburzenia aktywności AspAT i AlAT w osoczu krwi u ludzi w stanach hiperlipemii i u zwierząt skarmianych aterogenną — bogatotłuszczową dietą (4, 9, 10), jak też wzrost aktywności AspAT w surowicy krwi u ludzi chorych na miażdżycę (3) nie są powodowane zakłóceniami aktywności tych enzymów w ścianach naczyń ze zmianami arteriosklerotycznymi. Obserwowane w hiperlipemii zmiany w aktywności AlAT i AspAT należy raczej przypisać ogólnoustrojowym zaburzeniom w stanie „metabolicznego stresu” (4, 9, 10). Wzrost aktywności AspAT i AlAT w układzie krążenia może być też wyrazem bądź wtórnego uszkodzenia wątroby i manifestować się zwiększoną podażą enzymów do krwi, bądź wynikiem hamującego działania lipidów na układ inhibitorów dla tych aminotransferaz w hiperlipemicznym osoczu.

Na podstawie przeprowadzonych w niniejszej pracy badań nie można udzielić odpowiedzi na pytanie, czy obserwowany w miażdżycy wzrost aktywności AspAT w surowicy (3) ma źródło w naczyniach ze zmianami arteriosklerotycznymi na skutek wzmożonej przepuszczalności ich błon dla tego enzymu. Pełna odpowiedź wymaga dalszych badań.

Otrzymane wyniki pozwalają natomiast twierdzić, że w bezkomórkowych wyciągach błon wewnętrznych i środkowych tętnic głównych ze zmianami arteriosklerotycznymi u świń nie ma istotnych zaburzeń aktywności aminotransferaz AspAT i AlAT. Tym samym wyniki oznaczeń nad aktywnością AspAT i AlAT uzyskane przez nas są uzupełnieniem stwierdzeń i zgodne z wnioskami autorów, którzy w tętnicach ze zmianami arteriosklerotycznymi u człowieka i zwierząt w badaniach enzymatycznych przeprowadzonych metodami biochemicznymi (7, 8, 13—17, 21) lub histochemicznymi (8) wykazali, że w ścianach aort pewne enzymy, np. klasy oksydoreduktaz, nie wykazywały zmian (8, 16), podczas gdy inne w klasie hydrolaz, np. proteolityczne i lipolityczne, zmiany te wykazywały (7, 8, 13—17).

Stwierdzenia takie, konkretnie brak różnic w aktywności dehydrogenaz kwasu mlekowego i jabłkowego przy zakłóceniu aktywności hydrolazy estrów glicerynowych, hydrolazy fosfolipidów i hydrolazy estrów sterydowych, w ścianie aorty u królików z doświadczalną arteriosklerozą, pozwoliły Patel ski em u i wsp. (16) wnioskować, że zaburzenia aktywności enzymów w ścianie tętnicy głównej, *relata refero*, związane są z enzymami o „funkcji specyficznej”, nie dotyczą natomiast ogólnej aktywności metabolicznej naczynia. Wyniki badań przedstawione w niniejszej pracy oraz wcześniejsze nasze badania (13, 14) wniosek ten popierają.

PIŚMIENNICTWO

1. Cucuianu M., Popescu T. A., Opinacaru A., Haracus S.: Serum pseudocholinesterase and ceruloplasmin in various types of hiperlipoproteine-mia". Clin. Chim. Acta 59, 19, 1975.
2. Docovleto P. E., Zhversmit D. B.: Lipoprotein lipase activity in bovine aorta. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 148, 1101, 1975.
3. Homolka J.: Biochemia kliniczna. PZWL, Warszawa 1971.
4. Katchman B. J., Zipf R. E.: Correlation between triglycerides and glutamic-pyruvic transaminase in men on high-fat diets. Clin. Chem. 16, 118, 1970.
5. Kądziołka A., Mierzejewski T., Ruciński T., Nowak J.: Metabolizm błony wewnętrznej aorty świń. Cz. I. Zastosowanie chromatografii cienkowarstwowej do oznaczeń związków tłuszczowych w ścianie aorty. Annales UMCS, sect. D, 29, 134, 1974.
6. Krawczyński J.: Zasady doboru badań laboratoryjnych. PZWL, Warszawa 1969.
7. Maier N., Hajmovici H.: Metabolism of arterial tissue with special reference to esterase and lipase. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 118, 258, 1965.
8. Maier N.: Metabolism of arterial tissue and its relation to arteriosclerosis. Ann. N. Y. Acad. Sci. 149, 655, 1968.
9. Mierzejewski T., Truchliński J.: Wpływ diety miazdżycotwórczej na poziom aktywności aminotransferaz: asparaginianowej 2.6.1.1. (AspAT) i alaminowej 2.6.1.2. (AlAT) w osoczu kogutów rasy „zielononóżka”. Med. Wet. 29, 613, 1973.
10. Mierzejewski T., Truchliński J.: Aktywność aminotransferaz w osoczu kogutów żywionych karmą miazdżycotwórczą z dodatkiem kumaryny. Med. Wet. 30, 113, 1974.
11. Mierzejewski T.: Aktywność lipolityczna osocza w doświadczalnej arteriosklerozie kogutów. Med. Wet. 30, 366, 1974.
12. Mierzejewski T.: Wpływ kumaryny na aktywność lipolityczną w hiperlipemicznym osoczu kogutów. Pol. Arch. Wet. 18, 215, 1975.
13. Mierzejewski T., Kądziołka A., Słowikowska B.: Metabolizm błony wewnętrznej aorty świń. Cz. II. Aktywność lipolityczna w wyciągach homogenatów intymy i medii tętnicy głównej. Annales UMCS, sect. DD, 29, 140, 1974.
14. Mierzejewski T., Kądziołka A., Słowikowska B.: Metabolizm błony wewnętrznej aorty świń. Cz. III. Aktywność proteolityczna homogenatów intymy i medii tętnicy głównej. Annales UMCS, sect. DD, 29, 145, 1974.
15. Patelski J.: Esteraza cholesterolowa tętnicy głównej. PZWL, Warszawa 1964.
16. Patelski J., Bowyer D. E., Howard A. N. i inn.: Modification of enzymes activities in experimental atherosclerosis in the rabbit. Atherosclerosis. 12, 41, 1970.
17. Patelski J., Howard A. N., Bowyer D. E., Gresham G. A.: Changes in phospholipase A, lipase and cholesterol esterase activity in the aorta in experimental atherosclerosis in the rabbit and rat. J. Atheroscler. Res. 8, 221, 1968.
18. Reitman S., Frankel S.: A colorimetric method for determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. Am. J. Clin. Pathol. 28, 56, 1957.

19. Slayton C. A., Szepesi B.: The role of high fat diet in the repression of two rat liver enzymes. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **144**, 876, 1973.
20. Smith E. B.: The influence of age atherosclerosis of the chemistry of aortic intima. *J. Atheroscler. Res.* **5**, 224, 1965.
21. Zemplenyi T.: Enzymes of the arterial wall. *J. Atheroscler. Res.* **2**, 2, 1962.
22. Zieliński R.: *Tablice statystyczne*. PWN, Warszawa 1972.

Pierwsza wersja pracy wpłynęła 24 VI 1977 r., druga poprawiona — 30 V 1980 r.

РЕЗЮМЕ

Сразу же после убоя изолировали грудной и брюшной отрезки аорт, которые были промыты холодной водой (7°C), разрезаны, осушены фильтровальной бумагой и заморожены. Замороженные внутренние оболочки размельчали в ступах, находящихся во льду. Затем растерали со стеклянной пылью, добавляя холодный (0°C) 30% водный раствор глицерола (5 мл 30% глицерола/1 г ткани).

В гомогенатах 14 оболочек аорт с макроскопическими артеросклеротическими изменениями (A) и 14 оболочек без артеросклеротических изменений (Bz) определено активность глутаматаспартаттрансаминазы AspAT и AlAT при помощи метода Рейтмана и Франкеля. Не обнаружено статистически существенных ($\alpha=0,05$) разниц в активности AspAT и AlAT между группами A и Bz.

SUMMARY

Immediately after slaughter the thoracic and abdominal sections of pigs' aortas were isolated, placed in ice, washed in cold water (ca. +7°C), dissected and dried with filter paper. The intima and a part of the media were isolated and frozen. The frozen membranes were comminuted in mortars, placed in ice, reduced to a pulp and mixed with glass dust. Cold (0°C) 30 per cent water solution of glycerol was added in portions to the pulp in relation of 5 ml of the glycerol solution per 1 of tissue.

On the basis of the method described by Reitman and Frankel, the aminotransferase activities AspAT — L Aspartate: 2 oxoglutarate aminotransferase (2.6.1.1.) and AlAT — L Alanine: 2 oxoglutarate aminotransferase (2.6.1.2.) were determined in the extracts of the homogenates of 14 membranes with arteriosclerotic changes (A) detected macroscopically and 14 membranes without such changes (Bz). A comparison of aminotransferase activities in the extracts of (A) and (Bz) homogenates was carried out by the mean identities test of two normal populations. No statistical differences ($\alpha=0.05$) between (A) and (Bz) extracts were found.