

ANNALES  
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA  
LUBLIN—POLONIA

VOL. XXVI, 8

SECTIO DD

1971

Katedra Chemii Fizjologicznej Wydziału Weterynaryjnego WSR w Lublinie

Janusz WIERCIŃSKI, Tadeusz MIERZEJEWSKI

**Badanie proteinaz w moczu królików po dożylnych iniekcjach białka.  
I. Stałe kinetyczne dla kazeinolitycznej proteinazy w fizjologicznym  
moczu królików nie indukowanych kazeiną**

Исследования протеиназ в моче кроликов после внутривенной инъекции белка.

I. Кинетические постоянные кazeинолитической протеиназы в моче кроликов,  
неиндуцированных кazeином

Studies of Proteinases in the Urine of Rabbits after Intravenous Injections of Protein. I. Kinetic Constants for Caseinolytic Proteinase in the Physiological Urine of Rabbits not Induced with Casein

W badaniach nad „alergenowo-specyficznym czynnikiem enzymatycznym” (5) wykazano, że aktywność kazeinolityczna w fizjologicznym moczu królików nie jest uwarunkowana obecnością uropepsyny, urokinazy czy też plazminy, a związana jest z obecnością jakiegoś innego enzymu proteolitycznego. W niniejszej pracy określono wartość stałej szybkości reakcji i stałej Michaelisa dla tego enzymu.

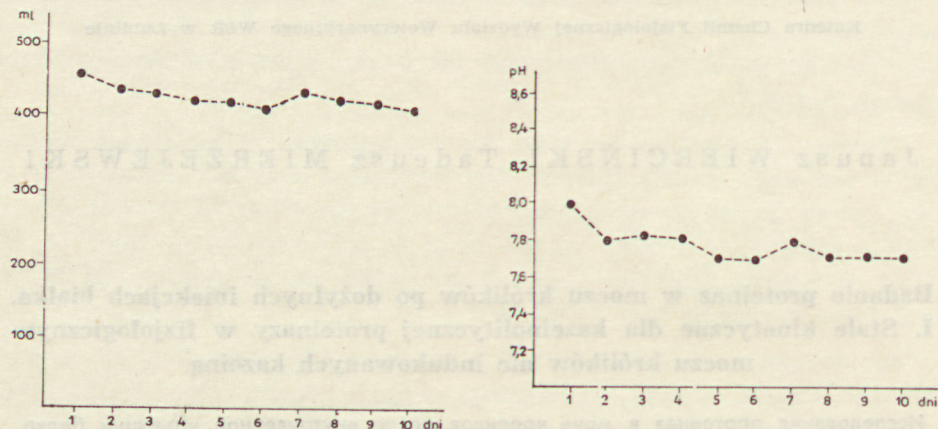
**MATERIAŁ I METODY**

Badania przeprowadzono na moczu królików rasy „szynszyl” wolnych od pasożytów jelitowych, o ciężarze 2200—2300 g. Zwierzęta adaptowano przez 1 tydzień w klatkach metabolicznych. Po okresie adaptacji zbierano mocz w porcjach dobowych przez 10 dni. Naczynia, do których mocz zbierano, chłodzone były lodem; temperatura moczu w pojemnikach nie przekraczała  $+5^{\circ}\text{C}$ . Każdą dobową porcję moczu wirowano 20 min. przy 4000 obr./min., a klarowny mocz oddzielano od wypadającego osadu przez dekantację. Każdorazowo oznaczano pH moczu, jego ciężar właściwy i objętość (ryc. 1, 2, 3).

Enzym z moczu wyosabniano w oparciu o metodę Nowickiego (6). Mocz doprowadzano do pH 7 przy pomocy 0,15 M HCl. Wytrącony osad oddzielano przez wirowanie. Otrzymany płyn przy stałym wstrząsaniu zadawano równą objętością bezwodnego acetonu oziębionego do  $-5^{\circ}\text{C}$ . Po 20 minutach wirowano przez 10 min. przy 2000 obr./min. Uzyskany osad pozbawiano resztek acetonu i płynu — po czym rozpuszczano osad w 0,9% NaCl o pH 7,4 w objętości równej 1/10 objętości wyjś-

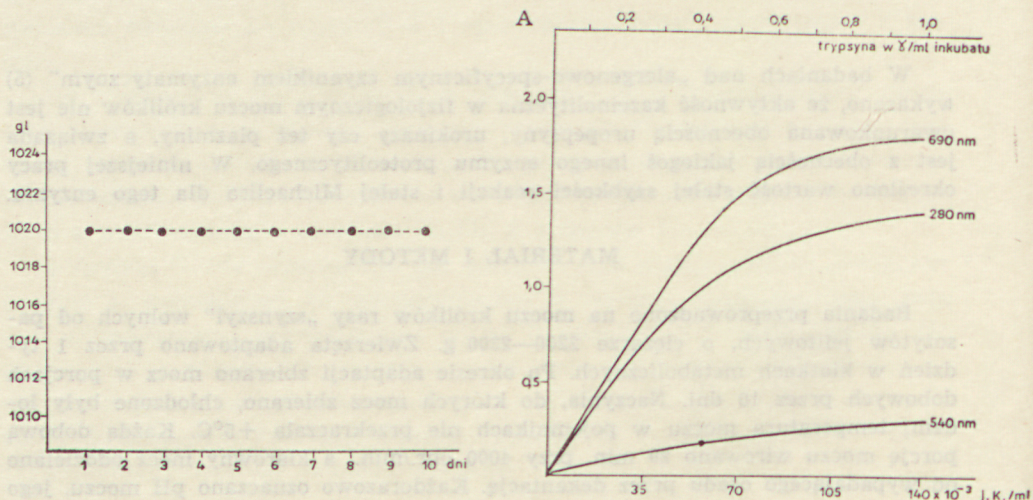


ciowej moczu. Ponieważ roztwory nie zawsze były klarowne, wirowano je przez 20 minut, przy 4000 obr./min. Osad odrzucano. Klarowny, zabarwiony na żółto płyn stanowił materiał wyjściowy do oznaczeń aktywności enzymu kazeinolitycznego (EK) z moczu.



Ryc. 1. Objętość wydzielanego moczu mierzona na 1 królika w ml/dobę  
Volume of the secreted urine measured per 1 rabbit in ml/day

Ryc. 2. pH wydzielanego moczu  
pH of the secreted urine



Ryc. 3. Ciężar właściwy dobowych porcji moczu w g/l  
Specific gravity of the 24-hr urine in g/l

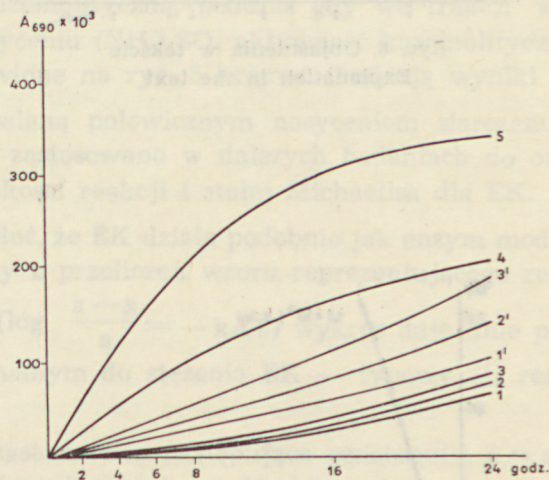
Ryc. 4. Jednostki Kunitza dla trypsyny; układ: objętość inkubatu — 2 ml, substrat — kazeina — 0,5%, czasu inkubacji — 20 min., temperatura — 35,5°C  
Kunitz units for trypsin; system: volume of the incubated mixture — 2 ml, substrate — 0,5% casein, time of incubation — 20 min., temperature — 35,5°C



W doświadczeniach zastosowano warunki pH i temperatury reakcji stosowane w pracy przy oznaczaniu „alergenowo-specyficznego czynnika enzymatycznego” (5).

Aktywność kazeinolityczną EK określano z ilości strawionej kazeiny i wyrażano w jednostkach Kunitza—j.K. (3), stosowanych dla trypsyny (ryc. 4). Trypsynę (prod. BDH) przyjęto w naszych badaniach za ferment modelowy w stosunku do EK. Założono, że proteolityczna czynność trypsyny sprowadza się do dobrze zdefiniowanego działania enzymatycznego.

Proteolizę (kazeinolizę) przerywano przez dodanie do inkubowanej mieszaniny równej objętości 5% kwasu trójchlorooctowego. Oznaczano po odwirowaniu produkty rozpuszczalne i precypitat w 2,5% TCA. W materiale rozpuszczalnym w TCA metodą Heidelbergera i Mac Phersona (1) oznaczano kolorymetrycznie wzrost wartości absorpcji dla tyrozyny. W precypitacie rozpuszczonym w 1 ml 0,5 m NaOH (3) oznaczano ubytek kazeiny metodą spektrofotometryczną przy 280 nm oraz kolorymetrycznie—metodami Lowry (4) i Pardee (7)—ryc. 4.



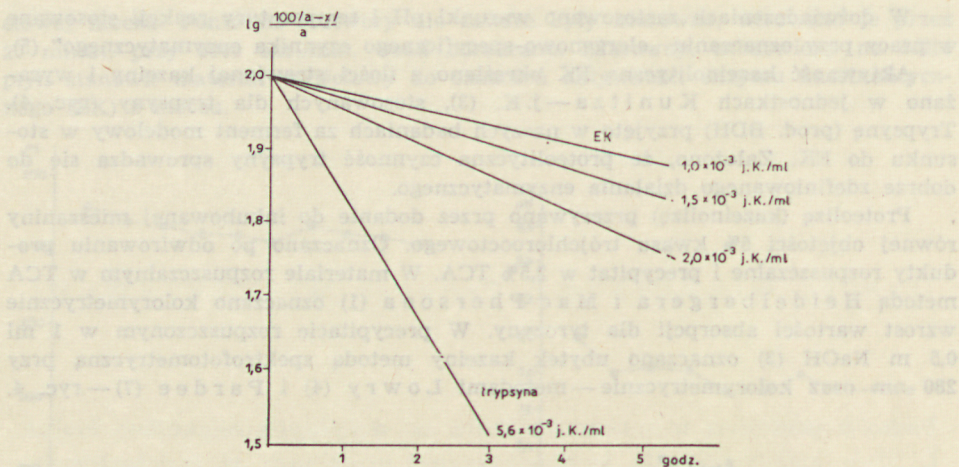
Ryc. 5. Aktywność kazeinolityczna EK i trypsyny; krzywa 1 — EK przed dializą w stęż. 2,5 ml/15 ml inkubatu, krzywa 2 — EK przed dializą w stęż. 5,0 ml/15 ml inkubatu, krzywa 3 — EK przed dializą w stęż. 7,5 ml/15 ml inkubatu, krzywa 1' — EK po dializie w stęż. 2,5 ml/15 ml inkubatu, krzywa 2' — EK po dializie w stęż. 5,0 ml/15 ml inkubatu, krzywa 3' — EK po dializie w stęż. 7,5 ml/15 ml inkubatu, krzywa 4 — frakcja EK 50%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  w stężeniu odpowiadającym 5,0 ml EK przed dializą/15 ml inkubatu, krzywa 5 — trypsyna w stęż.  $5,6 \cdot 10^{-3}$  j.K./ml inkubatu.

Układ: kazeina 0,5% obj. inkubatu 15 ml, temp.  $35,5^\circ\text{C}$

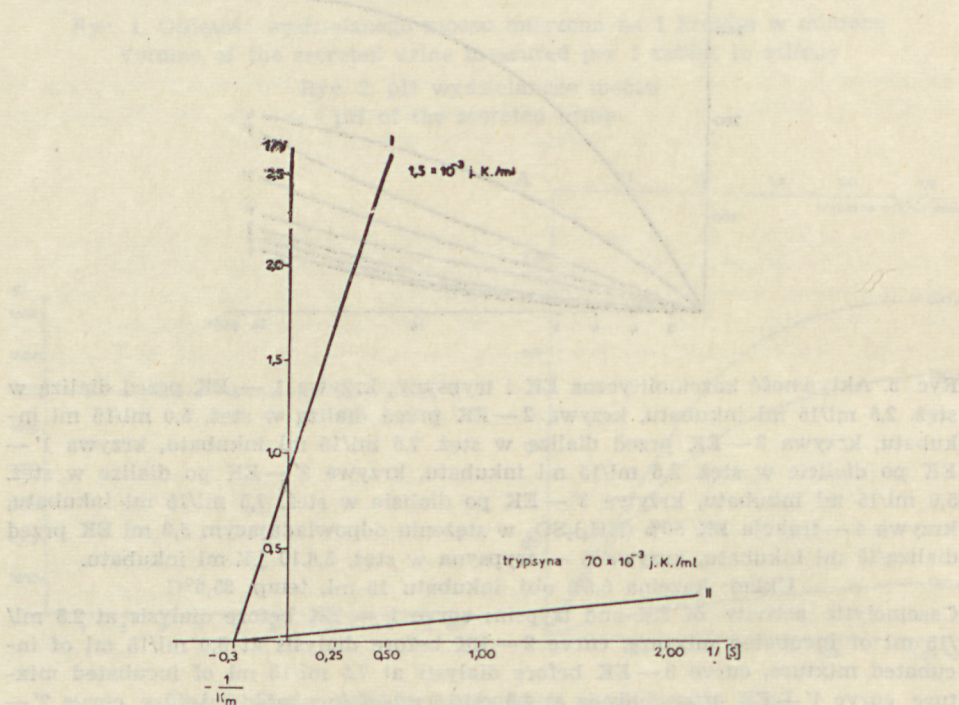
Caseinolytic activity of EK and trypsin; curve 1 — EK before dialysis at 2.5 ml/15 ml of incubated mixture, curve 2 — EK before dialysis at 5.0 ml/15 ml of incubated mixture, curve 3 — EK before dialysis at 7.5 ml/15 ml of incubated mixture, curve 1' — EK after dialysis at 2.5 ml/15 ml of incubated mixture, curve 2' — EK after dialysis at 5.0 ml/15 ml of incubated mixture, curve 3' — EK after dialysis at 7.5 ml/15 ml of incubated mixture, curve 4 — EK fraction 50%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  at concentration corresponding to 5.0 ml EK before dialysis/15 ml of incubated mixture, curve 5 — trypsin at  $5,6 \cdot 10^{-3}$  Kunitz units/ml of incubated mixture. Sys-

tem: 0,5% casein, incub. volume 15 ml, temp.  $35,5^\circ\text{C}$





Ryc. 6. Objaśnienia w tekście  
Explanation in the text



Ryc. 7. Zależność odwrotności szybkości reakcji od odwrotności stężenia kazeiny  
dla EK (I) i trypsyny (II)

Relation between the reciprocal of reaction velocity and reciprocal of casein concentration for EK (I) and trypsin (II)



## WYNIKI

Aktywność kazeinolityczna roztworów otrzymanych z acetonowych osadów EK była bardzo niska (ryc. 5). 10-godzinna dializa EK w przepływie wodą destylowaną o temp.  $+4^{\circ}\text{C}$  pozwoliła na uzyskanie preparatu o aktywności ponad dwukrotnie wyższej. W celu dalszego oczyszczenia i zagęszczenia EK wysalano białko z roztworu wyjściowego przez połowiczne i całkowite wysycenie siarczanem amonowym przy pH 7,4. Wypadnięte osady rozpuszczano w buforze fosforanowym o pH 7,4 i dializowano przez 10 godz. w przepływie wodą o temp.  $+4^{\circ}\text{C}$ . W wyniku tej prostej preparacji we frakcji precypitującej przy połowicznym wysyceniu EK siarczanem amonowym otrzymano preparat obdarzony aktywnością kazeinolityczną, podczas gdy we frakcji wysalanej przy całkowitym nasyceniu  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  aktywność kazeinolityczna była bardzo niska. Przedstawione na ryc. 5 krzywe ilustrują wyniki tych oznaczeń.

Frakcję wysalaną połowicznym nasyceniem siarczanu amonu [EK 50%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ] zastosowano w dalszych badaniach do oznaczenia wartości stałej szybkości reakcji i stałej Michaelisa dla EK.

Na ryc. 6 widać, że EK działa podobnie jak enzym modelowy — trypsyna. Otrzymany z przeliczeń wzoru reprezentującego reakcję enzymatyczną I rzędu ( $\log \frac{a-x}{a} = -kAt$ ) wykres daje linie proste o nachyleniu proporcjonalnym do stężenia EK — typowy dla reakcji monomolekularnej.

We wzorze zastosowano następujące oznaczenia:  $a$  = stęż. substratu,  $x$  = stęż. produktu,  $k$  = stała szybkości reakcji,  $A$  = stężenie enzymu wyrażone w jednostkach Kunitza,  $t$  = czas inkubacji w minutach.

Stała szybkości reakcji ( $k$ ) wyliczona z danych przeprowadzonego doświadczenia dla preparatu EK z moczu królików wynosiła 0,45, a dla

trypsyny (enzymu modelowego) 0,48  $\frac{1}{\text{j.K.} \times \text{godz.}}$

W kolejnym doświadczeniu oznaczono zależność szybkości kazeinolizy powodowanej EK i trypsyną od stężenia substratu. Ryc. 7 przedstawia tę zależność w układzie współrzędnych Lineweavera i Burka. Ponieważ proste przecinają oś  $1/V$  w punktach 0,93 dla EK i 0,03 dla trypsyny,  $V_{\text{max}}$  wynosi odpowiednio: 1,08 mg kazeiny/godz. dla EK i 33,3 mg kazeiny/godz. dla trypsyny.

Punkty przecięcia prostych dla trypsyny i EK z osią  $X$  wypadają w jednym miejscu przy wartości — 0,3, więc  $K_m$  dla EK i trypsyny posiada tę samą wartość równą 3,33 mg kazeiny.



## OMÓWIENIE

Enzymy wydalone z moczem mogą być pochodzenia nerkowego albo z osocza krwi, ulegając przesączeniu w kłębuszkach nerkowych. Kłębuszki nerkowe nie przepuszczają na ogół ciał białkowych o masie cząsteczkowej większej niż 68 000 (cyt. wg 8). Do takich enzymów zaliczamy rybonukleazę (M.cz. = 12 700), chymotrypsynę (M.cz. = 23 000), trypsynę (M.cz. = 23 800), pepsynę (M.cz. = 34 500) i amylazę (M.cz. = 45 000) — cyt. wg 2.

W badaniach nad „alergenowo-specyficznym czynnikiem enzymatycznym” (5) wykazano, że preparaty acetonowe w fizjologicznym moczu królików posiadały aktywność kazeinolityczną. Ponieważ aktywność ta nie była uwarunkowana uropepsyną, plazminą ani też urokinazą, w pracy niniejszej określano EK wobec enzymu modelowego — trypsyny. Z osadów acetonowych z moczu zagęszczano EK we frakcji wysalanej przy połowicznym nasyceniu siarczanem amonowym przy pH 7,4 (ryc. 5). Nagromadzenie się aktywności kazeinolitycznej w tej frakcji koliduje częściowo z wynikami otrzymanymi w pracy nad „alergenowo-specyficznym czynnikiem enzymatycznym” (5), gdzie gros aktywności kazeinolitycznej nagromadziło się we frakcji wysalanej w 0,6—0,8 nasyceniu  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  roztworów acetonowych z moczu. Podobnie jednak jak w niniejszej pracy Hedin i Mall (cyt. wg 5) otrzymywali „niespecyficzny enzym proteolityczny” albo „proteazę pierwotną” z osadów acetonowych moczu przy połowicznym nasyceniu ich roztworów siarczanem amonowym w pH 4,5.

Wyniki oznaczenia stałej szybkości reakcji i stałej Michaelisa dla EK wobec enzymu modelowego — trypsyny, przedstawione na ryc. 6 i 7, pozwalają przypuszczać, że EK jest enzymem podobnym do trypsyny, ponieważ wartości stałej szybkości i stałej Michaelisa są dla tych enzymów bliskie ( $k$ ) bądź równe ( $K_m$ ).

Dane te nie upoważniają do utożsamiania EK z trypsyną, a wymagają dalszych badań na oczyszczonych preparatach EK. Można przypuszczać, że EK reprezentuje sobą katepsynę osocza krwi o optimum działania w pH 7, przesączaną do moczu.

## WNIOSKI

1. Aktywność kazeinolityczna enzymu proteolitycznego acetonowego osadu z fizjologicznego moczu królików (EK) gromadzi się we frakcji precypitującej przy połowicznym wysyceniu roztworów siarczanem amonowym w pH 7,4.



2. Stała szybkości reakcji dla EK wynosi  $0,45 \frac{1}{j. K. \times godz.}$
3. Stała Michaelisa dla EK — Km równa się 3,33 mg kazeiny.

## PIŚMIENNICTWO

1. Heidelberger M., Mac Pherson C. F. C.: Quantitative Micro-Estimation of Antibodies in the Sera of Man and Other Animals. Science, 97, 405, 1943.
2. Krawczyński J. [red.]: Diagnostyka enzymologiczna w medycynie praktycznej. PZWL, Warszawa 1965.
3. Kunitz M.: Crystalline Soybean Trypsin Inhibitor. II. General Properties. J. Gen. Physiol., 30, 291, 1947.
4. Lowry O. H. i inni. Protein Measurements with the Folin Phenol Reagent. J. Biol. Chem., 193, 265, 1951.
5. Mierzejewski T.: Badania nad „alergenowo-specyficznym czynnikiem enzymatycznym”. II. Próby wydzielania z moczu królików „alergenowo-specyficznego czynnika enzymatycznego”. Polskie Arch. Wet., 10, 627, 1967.
6. Nowicki E. L.: Studies on Enzymatic Factor in Course of Immunization. Texas Rep. Biol. Med., 13, 848, 1955.
7. Pardee A. B.: wg Useful Methods for Research Bacteriology, 212 (seminar). Berkeley 1957.
8. Szczeklik E. [red.]: Enzymologia kliniczna. PZWL, Warszawa 1963.

## РЕЗЮМЕ

Ацетоновые осадки из мочи кроликов обнаруживали кazeинолитическую активность, которая не была обусловлена ни уропепсином, ни плазмином, ни урокиназой.

Постоянная скорости реакции (k) для осаждаемой фракции с 50% насыщением сульфатом аммония, полученной из ацетонового осадка мочи, составляет  $0,45 \frac{1}{j. K. \times час}$ . Постоянная Михаэлиса для этой фракции составляет 3,33 мг кazeина. Значения этих постоянных близки значениям соответствующих постоянных для трипсина ( $k = 0,48 \frac{1}{j. K. \times час}$ ,  $K = 3,33$  мг кazeина).

## SUMMARY

Acetone precipitates from the physiological urine of rabbits displayed caseinolytic activity which did not depend upon uropepsin, plasmin or urokinase.



The constant of reaction velocity ( $k$ ) for the fraction, which was salted out with 50% ammonium sulphate saturation and obtained from the urine acetone precipitate, amounted to  $0.45 \frac{1}{\text{Kunitz units} \times \text{hr}}$ . Michaelis constant for this fraction amounted to 3.33 mg of casein. The values of these constants were approximate to the values of corresponding constants for trypsin ( $k = 0.48 \frac{1}{\text{Kunitz units} \times \text{hr}}$ ,  $K_m = 3.33 \text{ mg of casein}$ ).