

Marian WIŚLIŃSKI, Andrzej SIWEK

Wpływ agonisty receptorów β -2 adrenergicznych clenbuterolu na syntezę proteaz w żołądku gruczołowym kurcząt

The Effect of β -2 Adrenoreceptor Agonist Clenbuterol on the Protease Synthesis in Glandular Stomach of Chickens

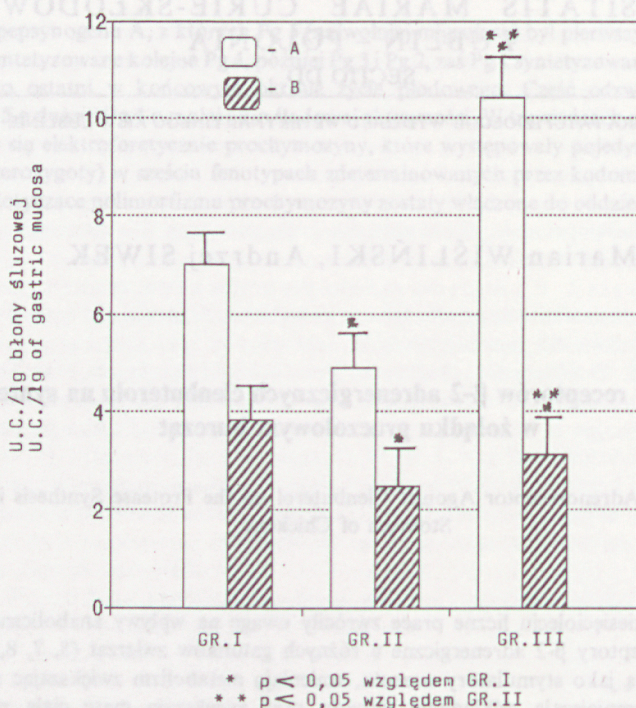
W ostatnim dziesięcioleciu liczne prace zwróciły uwagę na wpływy anaboliczne czynników pobudzających receptory β -2 adrenergiczne u różnych gatunków zwierząt (5, 7, 8, 17, 18, 20). Czynniki te działają jako stymulatory wzrostu, zmieniają metabolizm zwiększając syntezę i odkładanie białka, zmniejszają odkładanie tłuszczu oraz zwiększają masę ciała przy lepszym wykorzystaniu paszy (14). Związki te są badane jako potencjalne czynniki zwiększające produkcję zwierzęcą. Wśród wielu preparatów wpływających na metabolizm (cimeterol, selbutanol, trenololon i fenetrol) największym zainteresowaniem cieszy się clenbuterol. Jest on β -2 agonistą receptorów adrenergicznych o podobnych do adrenaliny własnościach chemicznych i farmakologicznych (14).

Zwiększone pod wpływem clenbuterolu wykorzystanie paszy przez zwierzęta może być między innymi związane ze zmianami w syntezie proteinaz żołądkowych. W większości doświadczeń preparat ten podawany był drogą doustną jako dodatek do karmy i mógł również działać bezpośrednio na komórki gruczołów błony śluzowej żołądka. Przemawia za tym również zmniejszona ilość wrzodów z podobną ilością nadżerek u odsadzonych cieląt, którym podawano clenbuterol (6).

Gruczoły żołądka kurcząt syntetyzują wiele form kwaśnych proteinaz (12, 13, 21, 24). Wpływ receptorów adrenergicznych na ich syntezę nie został jeszcze w pełni poznany. Zatem interesującym problemem było zbadanie wpływu clenbuterolu na syntezę proteaz żołądkowych. Żołądki kurcząt otrzymaliśmy po chronicznym podawaniu clenbuterolu w dwu różnych dawkach. Wielkość syntezy proteaz była mierzona ich aktywnością proteolityczną w wyciągach sporządzonych z błony śluzowej żołądka.

MATERIAŁ I METODA

Żołądki gruczołowe kurcząt otrzymano z doświadczeń opisanych wcześniej (4). Kurczęta (45) pochodzące z reprodukcyjnej wylęgarni żywione były przez pierwszy miesiąc mieszanką pełnowartościową DKA-starter *ad libitum*, następnie mieszanką finisher aż do uboju. Po 30 dniach i osiągnięciu masy 650-800 g kurczęta podzielono na trzy grupy: I – kontrolna, II – kurczęta, którym podawano codziennie clenbuterol *per os* w dawce 2,5 mg/kg m.c. i III – w dawce 5 mg/kg m.c. Każda z grup liczyła 15 kurcząt. Natychmiast po uboju pobierano żołądki gruczołowe i płukano kolejno:



Ryc. 1. Wpływ clenbuterolu na aktywność proteolityczną wyciągów żołądka gruczołowego kurcząt. A – całkowita potencjalna aktywność oznaczona testem ścinania mleka, B – potencjalna aktywność pepsynogenu PG/1 g błony śluzowej żołądka oznaczana na Hb bydlęcej

Effect of clenbuterol on proteolytic activity in chickens gastric mucosa extracts. A – total potential proteolytic activity determined by milk-clotting test, B – potential proteolytic activity of pepsinogen PG/1 g of gastric mucosa determined on bovine haemoglobin

w zimnej wodzie, w 2% roztworze NaHCO_3 , ponownie w zimnej wodzie, a następnie w buforze fosforanowym 0,1 M o pH 7,4 z dodatkiem 0,02% azydru sodowego. Po osuszeniu bibułą filtracyjną błonę śluzową zeszkrobywano i homogenizowano w 10 ml zimnego buforu fosforanowego 0,02 M o pH 7,4 na 1 g tkanki.

Homogenizację przeprowadzano dwukrotnie przez 1 min. przy 15 000 obr./min. (homogenizator typ MPW-120 Mechanika Precyzyjna). Homogenat wirowano przez 15 min. przy 5000 g w temp. 4°C , po czym oddzielano supernatant od osadu, który ponownie homogenizowano. Supernatanty z obydwu homogenizacji każdego żołądka zlewano razem, po czym natychmiast oznaczano aktywność proteolityczną. Całkowitą potencjalną aktywność proteolityczną oznaczano testem ścinania mleka według metody Berridge'a (3), 120 g odtłuszczonego mleka w proszku (OSM, Lubawa) rozpuszczano w 1000 ml wodnego roztworu 0,01 M CaCl_2 . Do 2 ml mleka dodawano 0,2 ml wyciągu zakwaszonego uprzednio równą ilością 0,1 M HCl . Po 30 min. wyciąg rozcieńczano wodą destylowaną do stężenia proteaz, których czas ścinania mleka wynosił od 300 do 360 s. Końcowe pH mieszaniny mleka i wyciągu wynosiło 6,3. Aktywność oznaczano w łaźni wodnej o temp. 37°C i wyrażano w jednostkach koagulacyjnych (U.C). Jednostkę stanowiła ilość aktywnych proteaz w 1 ml wyciągu, która ścinała 10 ml odtworzonego mleka w 100 s. Wszystkie oznaczenia wykonano w dwu powtórzeniach na mleku sporządzonym z jednego opakowania.

Potencjalną aktywność pepsynogenu oznaczano według metody Ansona i Mirsky'ego (2).

Do 2 ml zakwaszonej hemoglobiny bydlęcej (Biomed, Kraków) o stężeniu 20 g/l dodawano 0,2 ml wyciągu uprzednio zakwaszonego 0,1 M roztworem HCl do pH 2 i rozcieńczonego wodą destylowaną. Po inkubacji przez 10 min. w temp. 37°C reakcję przerywano przez dodanie 4 ml wodnego roztworu kwasu trójchlorooctowego o stężeniu 50 g/l. Gęstość optyczną produktów proteolizy oznaczano spektrofotometrem (Shimadzu UV-160A) w warstwie 1 cm przy 280 nm. Oznaczenia wykonano w dwóch powtórzeniach na hemoglobinie z jednego opakowania. Zakwaszony wyciąg rozcieńczano tak, że odczyty ekstynkcji proteolizy wynosiły od 0,200 do 0,300. Za jednostkę aktywności przyjęto wzrost ekstynkcji $\Delta E = 1,00$ w ciągu 10 min. i temp. 37°C. Próbe ślepą stanowiły te same składniki dodawane w kolejności: 2% roztwór hemoglobiny, kwas trójchlorooctowy oraz zakwaszony wyciąg. Wyniki badań w przeliczeniu na 1 g błony śluzowej poddano analizie statystycznej obliczając średnią arytmetyczną, odchylenie standardowe, istotność różnic między średnimi analizowano testem t Studenta.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Wpływ clenbuterolu na potencjalną aktywność proteolityczną w żołądkach kurcząt przedstawiono na ryc. 1. Podawany przez miesiąc clenbuterol w dawce 2,5 mg/kg m.c. spowodował obniżenie całkowitej aktywności proteolitycznej o 30,6% i aktywności pepsynogenów w oznaczeniach na hemoglobinie bydlęcej o 34,6% w porównaniu z grupą kontrolną. Podawany zaś w dawce 5 mg/kg m.c. wywoływał zwiększenie całkowitej aktywności oznaczonej testem ścinania mleka o 48% w porównaniu z grupą kontrolną i o 113,5% z grupą II. Aktywność proteolityczna pepsynogenów zmniejszyła się o 18% w porównaniu z aktywnością grupy I, ale uległa zwiększeniu o 20,4% w odniesieniu do aktywności grupy II, która otrzymywała o połowę niższą dawkę clenbuterolu. Stosunek całkowitej aktywności proteolitycznej do aktywności pepsynogenów w grupach I, II i III wynosił odpowiednio 1,84, 1,95 i 3,32.

Zawartość proenzymów w błonie śluzowej żołądka oznaczana różnymi metodami często była miarą ich syntezy (1, 9). Można przyjąć, że zmiany aktywności proteolitycznej pod wpływem dwu różnych dawek clenbuterolu odzwierciedlały wielkość syntezy proteaz żołądkowych.

W żołądkach ssaków występują cztery grupy proteaz: należą do nich pepsynogen A (PGA), progastryksyna albo pepsynogen C (PGC), prochymozyna (PCh) (9) i proteaza niepepsynogenowa, która jest prawdopodobnie katepsyną E (15, 29). Wszystkie one wykazują potencjalną aktywność ścinania mleka po uprzedniej aktywacji w niskim pH. Największą aktywnością ścinania mleka charakteryzuje się chymozyna (Ch) (9). W rozwoju kurcząt od 8 do 18 dni inkubacji występuje embrionalny typ pepsynogenu (EPG) (22, 24). Przejście od EPG do dojrzałego typu pepsynogenu (DPG) odbywa się w okresie wykluwania (22, 24). Pepsynogen typu dojrzałego wykazuje aktywność w niskim pH (10, 12, 13) i jest immunologicznie podobny do PG ssaków (22) oraz zawiera wiele frakcji o różnej migracji elektroforetycznej (21, 24). Embrionalny typ pepsynogenu należy do grupy chymozyn występujących u różnych zwierząt, wykazuje

podobne do prochymozyny właściwości immunologiczne (22, 23). Typ ten nie występuje u dojrzałych kur. PGC – z wyjątkiem gryzoni, u których stanowi główną proteazę (15, 19) – i katepsyna E występują w małym stężeniu u ssaków, zaś u kurcząt brak dotychczas danych. Dużą aktywność ścinania mleka wykazuje EPG kurcząt i Ch ssaków, znaczną aktywnością charakteryzuje się katepsyna E (19). Z danych uzyskanych po dużych dawkach clenbuterolu wynika, że agonista ten zmniejszał syntezę pepsynogenów w żołądku i jednocześnie zwiększał produkcję proteaz o dużej aktywności ścinania mleka. Enzymami tymi mogły być katepsyna E i EPG. Alternatywnym wyjaśnieniem mogły być zmiany pod wpływem clenbuterolu w proporcjach poszczególnych frakcji proteolitycznych DPG, których właściwości nie są jeszcze w pełni poznane.

Clenbuterol według danych z piśmiennictwa wykazuje duże powinowactwo do β -2 i słabe do β -1 receptorów adrenergicznych (14). W żołądkach zwierząt występują obydwa rodzaje receptorów, których proporcje ilościowe nie zostały jeszcze określone (16). Pod wpływem podawania kurczętom clenbuterolu w dawce 2,5 mg/kg m.c. prawdopodobnie zostają pobudzone β -2 receptory, które hamują syntezę pepsynogenu i w mniejszym stopniu inne proteazy o dużej aktywności ścinania mleka. Podawany w dawce 5 mg/kg m.c. wpływał w większym stopniu na β -1 receptory, które w mniejszym stopniu hamowały syntezę pepsynogenów, zaś znacznie stymulowały syntezę proteaz charakteryzujących się dużą aktywnością ścinania mleka, mimo że nie stanowi ono naturalnego pokarmu dla kurcząt.

Układ sympatyczny wykazuje również działanie inhibicyjne na wydzielanie żołądkowe (11, 16). Pobudzenie β -2 receptorów związane jest ze zwiększeniem katabolizmu (14). Wyrazem tego prawdopodobnie było zmniejszenie masy ciała kurcząt otrzymujących clenbuterol w dawce 2,5 mg/kg m.c., gdy podawany w dawce 5 mg/kg m.c. zwiększył masę ciała około 10% w porównaniu z kontrolą (R. Bobowiec, dane nie opublikowane). Dalsze badania na innych gatunkach zwierząt są niezbędne w celu potwierdzenia uzyskanych wyników.

WNIOSKI

1. Clenbuterol podawany w dawce 2,5 mg/kg m.c. hamował syntezę proteaz żołądkowych u kurcząt, podczas gdy w dawce 5 mg/kg m.c. zmniejszał w znacznym stopniu syntezę pepsynogenu (o aktywności proteolitycznej w niskim pH), ale znacznie zwiększył syntezę innych proteaz o dużej aktywności ścinania mleka.

2. Clenbuterol w mniejszej dawce pobudzał receptory β -2 adrenergiczne hamując syntezę proteaz, natomiast w dawce 5 mg/kg m.c. prawdopodobnie działał na receptory β -1 adrenergiczne, w wyniku czego zmalała synteza pepsynogenu, ale jednocześnie znacznie stymulowana była synteza innych proteaz o dużej aktywności ścinania mleka.

PIŚMIENNICTWO

1. Andr  n A., Bj  rck L.: Milk-feeding maintains the prochymosin production in cells of bovine abomasal mucosa. *Acta Physiol. Scand.* **126**, 419, 1986.
2. Anson M. L., Mirsky A. E.: The estimation of pepsin with hemoglobin. *J. Gen. Physiol.* **16**, 59, 1932.
3. Berridge N. J.: An improved method of observing the clotting time of milk containing rennin. *J. Dairy Res.* **19**, 328, 1952.
4. Bobowiec R., Radomska-Wawrzyniak K.: Wp  yw agonisty receptor  w β -2 adrenergicznych clenbuterolu na sk  ad frakcji lipoproteinowych osocza i typy w  łkien mi  śniowych u kurcz  t. *Med. Wet.* **50**, 457, 1994.
5. Bohorov O., Buttery P. J., Correla J. H. R. D., Soar J. B.: The effect of β -2-adrenergic agonist clenbuterol or implantation with oestradiol plus tenbolone acetate on protein metabolism in wether lambs. *Br. J. Nutr.* **57**, 99, 1987.
6. Breuking H. J., Wensing Th., van Dijk S., Mevins D.: Effect of clenbuterol on the incidence of abomasal ulcers in real calves. *Vet. Rec.* **125**, 109, 1989.
7. Dalrymple R. H., Baker P. K., Ginger P. E., Ingle D. L., Pensack J. M., Ricks C. A.: A repartitioning agent to improve performance and carcass composition of broilers. *Poultry Sci.* **63**, 2376, 1984.
8. Emery P. W., Rothwell N. J., Stock M. J., Winter P. D.: Chronic effects of β -2-adrenergic agonists on body composition and protein synthesis in the rat. *Biosci. Rep.* **4**, 83, 1984.
9. Foltmann B.: Gastric proteinases – structure, function, evolution and mechanism of action. *Essays Biochem.* **17**, 52, 1981.
10. Green M. L., Llewellyn J. M.: The purification and properties of a single chicken pepsinogen fraction and the pepsin derived from it. *Biochem. J.* **133**, 105, 1973.
11. Hersey S. J., Norris S. H., Gilbert A. J.: Cellular control of pepsinogen secretion. *Ann. Rev. Physiol.* **46**, 393, 1984.
12. Kostka V.: Chicken pepsin and the other avian aspartic proteinases. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **52** (210), 121, 1992.
13. Kostka V., Pichova I., Baudys M.: Isolation and Molecular Characteristics of Avian Pepsins. [In:] *Aspartic Proteinases and Their Inhibitors*. Kostka V., (ed.). Berlin-New York, Walter de Gruyter, 53, 1985.
14. Lafontan M., Berlan M., Prud'  on M.: Les agonistes b  ta-adrenergiques. M  canismes d'action: lipomobilisation et anabolisme. *Reprod. Nutr. D  velop.* **28** (1), 61, 1988.
15. Lai K. H., Wyckloff J. B., Samloff I. M.: Aspartic proteinases in gastric mucosa of the rat: absence of pepsinogen I, genetic polymorphism of pepsinogen II, and presence of slow-moving proteinase. *Gastroenterology*, **95**, 295, 1988.
16. Magee D. F.: Adrenergic activity and gastric secretion. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **151**, 659, 1976.
17. O'Lamhna M. P., Roche J. F.: Effect of long or short acting anabolic agents, given singly or repeated, on growth rate and carcase weight of steers. *Vet. Rec.* **114**, 182, 1984.
18. Rothwell N. J., Stock M. J., Sudera D. K.: Changes in tissue blood flow and β -2-adrenoreceptor agonist clenbuterol. *Br. J. Pharmac.* **90**, 601, 1987.
19. Samloff J. M., Taggart R. T., Shiraishi T., Branch T., Reid W. A., Heath R., Lewis R. W., Valler M. J., Kay J.: Slow moving proteinase. Isolation, characterization, and immunochemical localization in gastric mucosa. *Gastroenterology* **93**, 77, 1987.
20. Williams P. E. V., Pagliani L., Innes G. M.: The effect of a β -agonist (clenbuterol) on the heart rate, nitrogen balance and some carcass characteristics of veal calves. *Livestock Prod. Sci.* **15**, 289, 1986.

21. Wiśliński M., Kubiszyn J.: Badania frakcji pepsynogenowych u kurcząt w okresie rozwoju i pod wpływem różnego żywienia. *Pol. Arch. Wet.* **19**, 2, 1976.
22. Yasugi S., Matsunaga T., Mizuno T.: Presence of pepsinogens immunoreactive to anti-embryonic chicken pepsinogen antiserum in fish stomachs: possible ancestor molecules of chymosin of higher vertebrates. *Comp. Biochem. Physiol. (A)*, **91**, 565, 1988.
23. Yasugi S., Mizuno T.: Purification and characterization of embryonic chicken pepsinogen, a unique pepsinogen with large molecular weight. *J. Biochem.* **89**, 311, 1981.
24. Yasugi S., Mizuno T., Esumi H.: Changes in molecular species of pepsinogens in the development of the chick. *Experientia* **35**, 814, 1979.

SUMMARY

Effect of chronic treatment by clenbuterol on protease synthesis in proventriculus of chickens was studied. Measure of pepsinogen synthesis was proteolytic activity determined by using bovine haemoglobin at pH 2. Total proteolytic activity was measured by milk-clotting test. Clenbuterol taken in 2.5 mg/kg of body weight diminished potential proteolytic activity of pepsinogen by 34.6% and total proteolytic activity by 30.6%. Clenbuterol administered in a dose of 5 mg/kg during one month increased by 48% of total proteolytic activity in comparison with control but 113.5% of total proteolytic activity in comparison with control but 113.5% with that of taking 2.5 mg/kg group. Proteolytic activity of pepsinogen decreased by 18% in regard to control but increased by 20.4% in comparison with that which obtained 2.5 mg/kg of clenbuterol. Total potential proteolytic activity and potential pepsinogen activity ratios in control group, taking of clenbuterol in a dose of 2.5 mg/kg and that of 5 mg/kg were 1.84, 1.95 and 3.32 respectively. The obtained results show that clenbuterol administered in a dose of 2.5 mg/kg depressed total proteolytic activity and that of pepsinogen: but in a dose of 5 mg/kg depressed in smaller degree the synthesis of pepsinogen and increased highly the synthesis of proteinases responsible for high milk-clotting activity. It is concluded that clenbuterol administered in 2.5 mg/kg stimulated β -2 adrenoreceptors which inhibited pepsinogen and other protease synthesis but in a dose of 5 mg/kg inhibited in a smaller degree the synthesis of pepsinogen and increased in a higher degree that of proteases showing high milk-clotting activity by probably stimulating of β -2 adrenoreceptors. Further studies are needed with the use of other animal species to confirm these results.