

ne potential of the pancreatic acinar cells. *Experientia*, 1972, 28, 1037.

14. Price, H. L., Cooperman, L. H., Warden, J. C.: Control of the splanchnic circulation in man. Role of beta-adrenergic receptors. *Circ. Res.*, 1967, 21, 333.

15. Suda, Y., Robinson, L. A., White, T. T.: The

effects of adrenergic blocking agents on pancreatic secretion in dogs. *Ann. Surg.*, 1969, 625.

Adres autorów: 15-236 Białystok, ul. Skłodowskiej 24a, Klinika Gastrologiczna, Instytut Chorób Wewnętrznych AM.

ANDRZEJ KRYSZEWSKI
JOHN B. WHITFIELD
GRAHAM NEALE
DAVID W. MOSS

LONDON

WPLYW INHIBITORÓW SYNTEZY BIAŁEK NA AKTYWNOŚĆ ENZYMÓW — WSKAŹNIKÓW CHOLESTAZY W WARUNKACH DOŚWIADCZALNEJ ŻÓLTACZKI MECHANICZNEJ

EFFECT OF PROTEIN SYNTHESIS INHIBITORS ON THE ACTIVITY OF ENZYMES — CHOLESTASIS INDICATORS — IN EXPERIMENTAL MECHANICAL JAUNDICE

Klinika Gastroenterologiczna Royal Postgraduate Medical School, London — Kierownik Kliniki: prof. C. C. Booth

Badane zmiany aktywności fosfatazy alkalicznej (F. Alk), 5-nukleotydazy (5-NT) oraz gamma-glutamylotranspeptydazy (GGTP) w surowicy i tkance wątrobowej szczurów przez okres 8 dni po wywołaniu żółtaczką mechaniczną podwiązaniem przewodu żółciowego wspólnego. Obserwowano wzrost aktywności wszystkich tych enzymów w wątrobie, jednak wzrost 5-NT i GGTP nie był uchwytany przed upływem 48 godzin w porównaniu ze wzrostem F. Alk. stwierdzanym już po 12 godz. Wzrost aktywności enzymów we krwi był znacznie wyższy już w 12 godz. po zabiegu, przy czym maksymalny wzrost F. Alk. i 5-NT stwierdzono po 24 godz., natomiast GGTP nie wcześniej niż po 48 godz. Sugeruje to, że wzrost aktywności 5-NT i GGTP w surowicy nie jest wynikiem szybkiej syntezy tych enzymów w wątrobie. Możliwa jest proliferacja komórek zawierających te enzymy.

Podanie zwierzętom środków hamujących syntezę białek (cykloheximid i aktynomycyna D) powodowało częściowo hamowanie wzrostu aktywności F. Alk. w surowicy i wątrobie. Obydwa te środki powodowały też znamienne obniżenie aktywności F. Alk. w surowicy zwierząt kontrolnych, być może zależne od zaburzenia syntezy fosfatazy jelitowej.

Changes in the activity of alkaline phosphatase, 5-nucleotidase and gamma-glutamylotranspeptidase in the serum and liver tissue of rats were studied over a period of 8 days after inducing mechanical jaundice by binding the common bile duct. Increase in the activity of all the enzymes was noted. However, increase in 5-nucleotidase and gamma-glutamylotranspeptidase could not be traced before 48 hours while that in alkaline phosphatase was observed already after 12 hours. Increase of the enzymes activity in the blood was significantly higher already in the 12 hour following the operation. Maximum increase in alkaline phosphatase and 5-nucleotidase was observed after 24 hours while that in gamma-glutamylotranspeptidase not earlier than 48 hours. That would suggest that increase in the activity of 5-nucleotidase and gamma-glutamylotranspeptidase is not the result of their quick synthesis in the liver. There exists a possibility of proliferation of the cells which contain these enzymes.

Administering drugs inhibiting protein synthesis (cycloheximide and actinomycin D) caused partial inhibition of alkaline phosphatase activity increase in the serum and liver. Both drugs caused a significant decrease in alkaline phosphatase activity in the serum of controls probably due to disturbance in synthesis of enteric phosphatase.

DODATKOWE SŁOWA KLUCZOWE: cykloheximid · aktynomycyna D · fosfataza alkaliczna · 5-nukleotyda-za : gamma-glutamylotranspeptydaza

ADDITIONAL KEY-WORDS: cycloheximid · actinomycin D · alkaline phosphatase · 5-nucleotidase · gamma-glutamylotranspeptidase

Obserwacje kliniczne wykazują, że zmiany aktywności GGTP w surowicy w chorobach wątroby i dróg żółciowych przebiegają bardzo podobnie do zmian aktywności F. Alk. i 5-NT (9, 11, 19). Podobnie wywołana doświadczalnie żółtaczką mechaniczną u zwierząt powoduje szybki wzrost wszystkich tych enzymów. Ostatnio przeprowadzone badania sugerują, że wzrost aktywności F. Alk. może być spowodowany jej syntezą *de novo* w wątrobie (6, 13, 15). Produkcja tego enzymu może być zahamowana przez cykloheximid — inhibitor syntezy białek na etapie translacji albo przez aktynomycynę D, która hamuje transkrypcję DNA na RNA (6). *Righetti* i *Kaplan* rozszerzyli swe badania na ocenę aktywności 5-NT (14).

Podwiązanie przewodu żółciowego szczura prowadziło do szybkiego wzrostu aktywności w surowicy, podczas gdy w okresie 24 godzin obserwacji aktywność tego enzymu w wątrobie nie ulegała istotnym zmianom, a inhibitory syntezy białek nie hamowały wzrostu aktywności w surowicy. Z drugiej jednak strony stwierdzanie u pacjentów z przewlekłymi chorobami wątroby i dróg żółciowych oraz u zwierząt doświadczalnych (2) zwiększonej aktywności 5-NT i GGTP przez okres tygodni lub miesięcy może wskazywać na istnienie długoterminowych zmian w produkcji lub uwalnianiu tych enzymów. Z tego powodu podjęliśmy badania nad aktywnością tych enzymów w czasie 8 dni trwania całkowitej cholestazy u szczurów.

MATERIAŁ I METODYKA

Do doświadczeń użyto szczurów samców szczepu *Wistar* o wadze 150—250 g. Zabieg podwiązania przewodu żółciowego wspólnego wykonywano w lekkiej narkozie eterowej, unikając podwiązania przewodu trzustkowego. Grupy 5—14 zwierząt zabijano w 12, 24, 48, 96 i 192 godz. po zabiegu. Kontrolna grupa nie była poddana zabiegowi operacyjnemu. Zwierzęta skrawiono przez pobranie krwi z aorty, oddzielono surowicę i do momentu oznaczeń przechowywano w temp. 20°C. Inne grupy zwierząt otrzymywały do otrzewnowo cykloheximid w dawce jednorazowej 1 mikrog./g wagi albo aktynomycynę D 0,25 mikrog./g wagi, na 1 godzinę przed podwiązaniem przewodu żółciowego i były zabijane w 24 godz. po podaniu tych środków. Wątrobę przed usunięciem pefudowano *in situ* wstrzykując poprzez żyłę wrotną 10 ml. 0,25 M. roztwór sacharozy. Po wycięciu wątrobę homogenizowano przez 3 min. w 5 objętościach 0,25 M sacharozy. Homogenat następnie dzielono na dwie

części. Jedną do oznaczania F. Alk. (ekstrakcja butanolem) (10) i oznaczanie z fosforanem tonylu jako substratem (7) oraz drugą do oznaczenia aktywności GGTP met. Szasz'a (16) oraz 5-NT met. Campbell'a (3). W celu dokładnej ekstrakcji tych enzymów uprzednio jeszcze do 3 ml. pierwotnego homogenatu dodawano 5 ml. 1% dezoksychołanu sodu w 1% dwuwęglanie sodu i ponownie homogenizowano przez 3 min. Stężenie białek w homogenatach oznaczono met. Lowry i wsp. (8). Aktywność enzymów w surowicy oznaczano tymi samymi metodami.

WYNIKI

Średnie wartości aktywności enzymów w wątrobie i surowicy są przedstawione liczbowo w tabeli I oraz graficznie na rycinie 1. Zachowanie się aktywności F. Alk. i 5-NT w surowicy jest podobne, osiągając maksimum aktywności po 24 godz. Aktywność GGTP wzrasta również szybko, lecz w okresie 8 dniowej obserwacji nie osiąga poziomu maksymalnego.

Aktywność badanych enzymów wykazuje również znaczny wzrost w tkance wątrobowej po podwiązaniu przewodu żółciowego wspólnego. Jednakże wzrost aktywności 5-NT i GGTP jest opóźniony — najwcześniejszy znamieny wzrost aktywności stwierdza się dopiero po 96 godz. Aktywność GGTP w 8 dni po zabiegu nie osiąga jeszcze prawdopodobnie poziomu maksymalnego. W przeciwieństwie do tego aktywność F. Alk. osiąga maksymalny poziom w 12 godz. po zabiegu, zgodnie z poprzednimi badaniami (6).

Efekty stosowania cykloheximidu i aktynomycyny D przedstawiono na rycinie 2. Jak oczekiwano obydwie te środki hamowały częściowo wzrost aktywności F. Alk. w wątrobie i surowicy po wywołaniu cholestazy. Powodowały one również znamienne obniżenie aktywności F. Alk. w surowicy zwierząt kontrolnych. Zależać to może od zaburzenia produkcji fosfatazy jelitowej, skoro wiadomo, że ten izoenzym stanowi znaczną część aktywności w surowicy zwierząt (5). Stwierdzono również niewielki, lecz znamieny spadek aktywności fosfatazy wątrobowej w grupie kontrolnej otrzymującej aktynomycynę D.

Nie zaobserwowano, aby cykloheximid i aktynomycyna D wywierały wpływ na aktywność 5-NT i GGTP w surowicy i wątrobie zwierząt w 24 godz. po spowodowaniu żółtaczki mechanicznej. Oczekiwano tego biorąc pod uwagę bardzo powolny wzrost aktywności tych enzymów. Obserwacja tych zmian przez dłuż-

Tabela I

Wpływ długości trwania cholestazy na średnie wartości aktywności GGTP, F. Alk. i 5-NT w surowicy i tkance wątrobowej

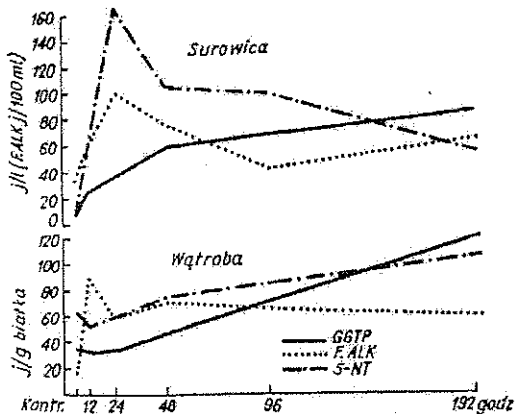
Effect of cholestasis time on mean values of GGTP, Alk. Ph. and 5-NT activity in serum and liver tissue

	Liczba zwierząt	Surowica			Wątroba		
		GGTP j.m./l.	F. Alk. j/100 ml	5-NT j.m./l.	GGTP j.m./g.b.	F. Alk. j/g.b.	5-NT j.m./g.b.
Cholestaza — 12 godzin	5	4,7 ± 1,32	62,4 ± 15,0	52,4 ± 33,9	(3,2) ± 1,5	90,1 ± 26,1	(53,6) ± 15,9
Cholestaza — 24 godziny	14	7,4 ± 1,7	100,1 ± 17,3	162,1 ± 28,4	3,4 ± 0,95	57,9 ± 21,9	(53,6) ± 13,3
Cholestaza — 48 godzin	5	11,5 ± 2,6	74,8 ± 12,3	104,5 ± 8,6	(4,5) ± 0,7	72,2 ± 13,7	(73,9) ± 8,0
Cholestaza — 96 godzin	9	11,5 ± 2,5	(41,4) ± 10,7	100,1 ± 54,2	6,9 ± 0,9	60,5 ± 24,0	82,7 ± 16,9
Cholestaza — 192 godziny	5	16,8 ± 9,3	62,4 ± 9,7	54,4 ± 12,8	12,5 ± 2,4	57,3 ± 16,3	107,1 ± 8,9
Kontrola	11	1,48 ± 0,9	33,3 ± 6,8	8,4 ± 6,9	3,7 ± 0,7	10,4 ± 3,3	63,8 ± 18,3

Aktywność w wątrobie podana w jednostkach gram białka

Srednie podane w nawiasach — nieznamienne statystycznie w porównaniu z grupą kontrolną

szy niż 24 godzin okres byłaby bardzo interesująca, lecz z powodu znacznej toksyczności tych środków podanych w dawce hamującej syntezę białek utrzymywanie zwierząt przy życiu odpowiednio długo było niemożliwe. Ak-



Ryc. 1. Wpływ długości trwania cholestazy na aktywność GGTP, F. Alk. i 5-NT
Effect of cholestasis time on the activity of GGTP, Alk. Ph. and 5-NT

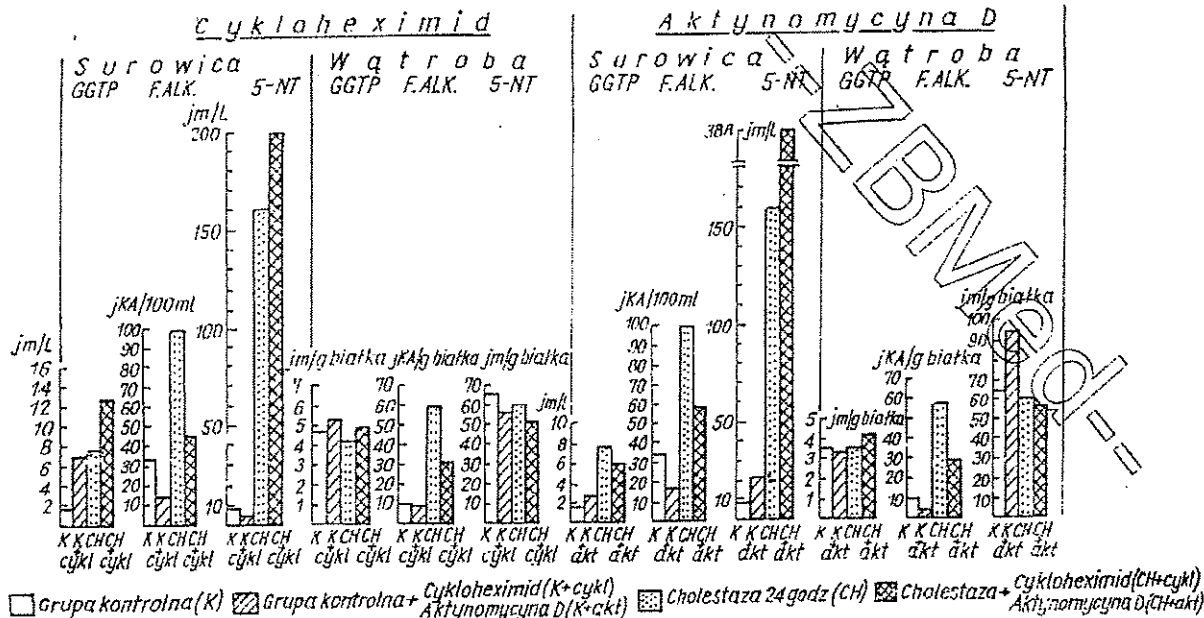
tywność 5-NT w surowicy zwierząt kontrolnych jak i operowanych wzrastała ok. 2-krotnie po podaniu aktywnymy D. Nieco mniejszy wzrost aktywności występował w wątrobie zwierząt kontrolnych. Podanie cykloheximidu zwierzętom kontrolnym i operowanym powodowało 2—3-krotny wzrost aktywności GGTP w surowicy po 24 godz.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Badania wykazały wzrost aktywności w wątrobie wszystkich trzech enzymów po podwiązaniu przewodów żółciowych. GGTP i 5-NT reagowały wolniej tak, że aktywność GGTP prawdopodobnie nie osiągnęła poziomu maksymalnego po 8 dniach. Kontrastuje to z szybkim wzrostem aktywności F. Alk. Pomimo podobieństwa w zachowaniu się 5-NT i GGTP istnieją tu jednak pewne różnice. Wzrost GGTP po podwiązaniu przewodów żółciowych zachodzi wolniej. Można by tu sądzić o szybkim wzroście syntezy F. Alk. (6) w przeciwieństwie do wolniejszej reakcji 5-NT i GGTP być może zależnej od stopniowej adaptacji komórek produkujących te enzymy do wzrostu zapotrzebowania na nie, bądź też od rozrostu komórek bogatych w te enzymy.

Rozrost przewodów żółciowych jest następstwem zastój zółci, a komórki nabłonkowe przewodów żółciowych mogą być źródłem GGTP i 5-NT. Temu poglądowi odpowiadają spostrzeżenia kliniczne wykazujące bardzo ścisły związek pomiędzy chorobami dróg żółciowych a wysokim poziomem aktywności 5-NT w surowicy (17). Wykazano również istnienie pewnej aktywności GGTP w nabłonku przewodów żółciowych wątroby szczurów (1) oraz spadek jej w miarę przedłużania się zastój zółci (2). Histochemiczne rozmieszczenie 5-NT w wątrobie nie jest jasno określone. W zdrowej wątrobie tak kanaliki żółciowe jak i tkanka łączna oraz sinusoidy zawierały ten enzym. Po wywołaniu zastój zółci nie stwierdzano go w nabłonku przewodów żółciowych (18).

Gdyby nawet można było wytłumaczyć



Ryc. 2. Wpływ inhibitorów syntezy białek na aktywność GGTP, F. Alk. i 5-NT po okresie 24 godz. cholestazy.
Effect of protein synthesis inhibitors on the activity of GGTP, Alk. Ph. and 5-NT after 24 hours of cholestasis.

zmiany enzymatyczne w wątrobie poprzez przyjęcie powolnego rozrostu komórek zawierających te enzymy, to nie można tej hipotezy zastosować do wytłumaczenia szybkiego wzrostu 5-NT i GGTP w surowicy po podwiązaniu przewodów żółciowych. Można by tu założyć kilka innych rozwiązań.

Podwyższony poziom aktywności tych enzymów w surowicy może zależeć od nagromadzenia ich w pozawątrobowych źródłach i uwalniających dzięki wtórnym efektom zastój na te tkanki lub zatrzymania w krążeniu z powodu upośledzenia ich wydalania w żółci. Takim narzędem bogatym w GGTP są nerki (11) i chociaż wykazano wpływ zastój żółci na stabilność lizosomów w nerce szczurów z podwiązaniem przewodami żółciowymi (4) to jednak nie udowodniono, aby pozawątrobowe zapasy GGTP przyczyniały się do wzrostu aktywności w surowicy. Pozawątrobowe, tak bogate źródła 5-NT nie są znane. Zatem nieprawdopodobnym wydaje się udział nagromadzonej pozawątrobowej GGTP i 5-NT.

Inną próbą tłumaczenia może być założenie, że zastój żółci uszkadzając komórki zawierające te enzymy prowadzi do ich wycieku do krwi. Utrata enzymów nie jest tak duża aby spowodować znaczne zmniejszenie ich zawartości w wątrobie — obserwowaliśmy w naszych doświadczeniach nieznaczne obniżenie aktywności wątrobowej 5-NT, lecz było ono statystycznie nieznamienne. Jeżeli przyjąć jednak tego rodzaju uszkodzenie komórki, to musi ono jednak różnić się od uszkodzenia powodującego uwolnienie takich enzymów jak aminotrans-

ferazy. W badaniach klinicznych stwierdzono bowiem brak korelacji pomiędzy tymi enzymami.

GGTP i 5-NT są silnie związane z elementami komórkowymi, np. białkami i wymagają energicznych zabiegów jak działanie ultradźwiękami lub stosowania detergentów albo rozpuszczalników organicznych, aby uwolnić je do roztworu. Badania Righetti'ego i Kuplana (14) sugerują, że nagromadzenie soli żółciowych może zwiększać *in vivo* ich rozpuszczalność u zwierząt z doświadczalną żółtaczką mechaniczną.

Innym jeszcze choć mało prawdopodobnym tłumaczeniem może być przyjęcie możliwości tak szybkiej ich syntezy, że przekracza ona możliwości wiązania tych enzymów przez wątrobę. Jednak przeczą temu nasze doświadczenia wskazujące, że podanie cycloheximidu i aktynomycyny D nie hamuje wzrostu ich aktywności a nawet przeciwnie powoduje nieznaczny jej wzrost.

WNIOSKI

1. Istnieje eksperymentalna podstawa dla obserwacji klinicznych, że F. Alk., 5-NT oraz GGTP zachowują się podobnie, lecz nie identycznie u pacjentów z przewlekłymi chorobami dróg żółciowych.

2. Oznaczanie aktywności 5-NT i GGTP w przewlekłym zastój żółci stanowi czulszy test aniżeli ocena aktywności F. Alk. (21).

3. Wzrost aktywności F. Alk. w żółtaczce mechanicznej jest spowodowany szybką syntezą tego enzymu w wątrobie.

А. Крышевски, Я. Б. Витфелд, Г. Неале, Д. В. Мосс: ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРОВ СИНТЕЗА БЕЛКОВ НА ФЕРМЕНТНУЮ АКТИВНОСТЬ — ПОКАЗАТЕЛЕЙ ХОЛЕСТЕРАЗЫ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МЕХАНИЧЕСКОЙ ЖЕЛТУХЕ

Исследованы изменения активности алкалической фосфатазы (АФ), 5-нуклеотидазы (5-нт) и гамма-глутамилтранспептидазы (ггтп) в сыворотке крови и печеночной ткани в течение 8 дней после появления симптомов механической желтухи, вызванной опытным путем, при помощи подвязки общего желчного протока. Наблюдали увеличение активности всех этих ферментов в печени, однако увеличение 5-нт и ггтп не было уловимым перед истечением 48 часов в сравнение с увеличением АФ, которое было обнаружено уже после истечения 12 часов. Увеличение ферментной активности в крови было статистически вышним уже после 12 часов с момента вмешательства, причем максимальное увеличение АФ и 5-нт обнаружено после 24 часов,

а ггтп не ранее, чем после 48 часов. Это обстоятельство указывает на то, что увеличение активности 5-нт и ггтп в сыворотке крови не является результатом быстрого синтеза этих ферментов в печени. Возможна в этих случаях пролиферация клеток, содержащих эти ферменты.

Введение животным препаратов, задерживающих синтез белков (циклогексимид и актиномицин Д), приводило к частичному задерживанию увеличения активности АФ в сыворотке крови и печени. Оба эти препарата приводили тоже к значительному снижению активности АФ в сыворотке крови контрольных животных, что может зависеть от нарушений синтеза кишечной фосфатазы.

R E S U M E N N I S T W O

1. Albert, Z., Orłowski, M., Szewczuk, A.: Histochemical demonstration of gamma-glutamyltranspeptidase. *Nature* 1961, 191, 767.
2. Aronsen, K. F., Norden, J. G.: Enzyme studies in dogs with extrahepatic biliary obstruction. *Scand. J. Gastroent.* 1968, 3, 355.
3. Cambell, D. M.: Determination of 5-nucleotidase in blood serum. *Biochem. J.* 1962, 82, 340.
4. Emanuelli, G., Satta, G., Perpignano, G.: Lysoosomal damage and its possible relationship with mitochondrial lesion in rat kidney under obstructive jaundice. *Clin. Chim. Acta* 1969, 25, 187.
5. Fishman, W. H., Green, S., Inglis, N. I.: Decline in rat-serum alkaline phosphatase following bile duct ligation. *Biochim. Biophys. Acta* 1962, 62, 429.
6. Kaplan, M. M., Righetti, A.: Induction of rat liver alkaline phosphatase: The mechanism of the serum elevation in bile duct obstruction. *J. Clin. Invest.* 1970, 49, 568.
7. Kind, P. R. N., King, E. J.: Estimation of plasma phosphatase by determination of hydrolysed phenol with amino-antipyrine. *J. Clin. Pathol.* 1954, 7, 222.
8. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951, 193, 265.
9. Lam, G., Gambino, S. R.: Serum gamma-glutamyltranspeptidase activity as an indicator of disease of liver, pancreas or bone. *Clin. Chem.* 1972, 18, 358.
10. Morton, R. K.: Separation and purification of enzymes associated with insoluble particles. *Nature* 1950, 166, 1092.

11. Orłowski, M.: The role of gamma-glutamyltranspeptidase in the internal diseases clinic. *Arch. Immunol. Therap. Exp.* 1963, 11, 1.
12. Phelan, M. B., Neale, G., Moss, D. W.: Serial studies of serum alkaline phosphatase and 5-nucleotidase levels in hepatobiliary disease. *Clin. Chim. Acta* 1971, 32, 95.
13. Polin, S. G., Spellberg, N. A., Teitelman, L., Okumuro, J.: The origin of elevation of serum alkaline phosphatase in hepatic disease. *Gastroenterology* 1962, 42, 431.
14. Righetti, A. B. B., Kaplan, M. M.: Disparate responses of serum and hepatic alkaline phosphatase and 5-nucleotidase to bile duct obstruction in the rat. *Gastroenterology* 1972, 62, 1034.
15. Sebesta, D. G., Bradshaw, F. J., Prockop, D. J.: Sources of the elevated serum alkaline phosphatase activity in biliary obstruction: Studies utilizing isolated liver perfusion. *Gastroenterology* 1964, 47, 166.
16. Szasz, G.: A kinetic photometric method for serum gamma-glutamyltranspeptidase. *Clin. Chem.* 1969, 15, 124.
17. Vinnik, I. E., Kern, F., Corley, W. D.: Serum 5-nucleotidase and pericholangitis in patients with chronic ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1963, 45, 492.
18. Wachstein, M., Meisel, E.: Substrate specific phosphatases at pH 7,2 in biliary obstruction and liver cell damage. *A.M.A. Arch. Pathol.* 1958, 65, 449.
19. Whitfield, J. B., Pounder, R. E., Neale, G., Moss, D. W.: Serum gamma-glutamyltranspeptidase activity in liver disease. *Gut* 1972, 13, 702.

Adres: 80-211 Gdańsk, ul. Dębinki 7, I Klinika Instytutu Chorób Wewnętrznych AM