

Karol Dziubek *

Zmiany aktywności gamma-glutamylotranspeptydazy (GGTP) w surowicy krwi *Rana temporaria* L. w cyklu rocznym

Streszczenie

Oznaczano aktywność γ - glutamylotranspeptydazy (GGTP) w surowicy krwi u dojrzałych płciowo samic i samców *Rana temporaria* L. pochodzących bezpośrednio z ich naturalnego środowiska. Stwierdzono małą aktywność badanego enzymu w okresie hibernacji, a odpowiednio wyższą w okresie ich życia aktywnego na lądzie. Wykazano ponadto wyższą aktywność GGTP u samic niż u samców.

W pracy dyskutowany jest problem zależności pomiędzy aktywnością GGTP, enzymem powodującym degradację glutationu a poziomem tego trójpeptydu. Wydaje się bowiem, że aktywność GGTP jest wyraźnie skorelowana z procesami syntezy glutationu.

WSTĘP

γ -glutamylotranspeptydaza (GGTP) jest enzymem związanym z zewnętrzną powierzchnią błon komórkowych, między innymi rąbka szczoteczkiwego kanalików proksymalnych nerki (Matsuda i inni, 1983), kapilar i spłotu naczyńniastego mózgu (Albert i inni, 1966; Rudel i Warzok, 1984), komórek glejowych (Shine i Haber, 1981) i komórek Purkinjego (Meister i inni, 1976).

* Zakład Fizjologii Zwierząt Instytutu Biologii WSP w Krakowie.

GGTP jest glikoproteidem i w połączonym działaniu z γ -glutamylcyklotransferazą uczestniczy w rozkładzie glutationu. Mianowicie katalizuje reakcję pomiędzy glutationem a aminokwasem, w której to reakcji odszczipiona zostaje cysteinyloglicyna, a reszta γ -glutamylowa glutationu tworzy odpowiedni γ -glutamiloaminokwas (Meister, 1973).

Anderson i współpracownicy (1980) wykazali, że dożylnie podawanie szczuprom L-glutamyl-/O-karboksy/fenylhydrazidu i AT-125 / α S,5S/- amino-3-chloro-4,5-dihydro-5-izoksazolo-octowego kwasu, związków będących inhibitorami GGTP, powoduje wzrost poziomu glutationu w surowicy krwi i prowadzi do glutationurii.

Zmiany poziomu glutationu w krwi *Rana temporaria* L. w cyklu rocznym zostały stwierdzone przez Dziubka (1987). Nie ma natomiast danych literaturowych w odniesieniu do zmian aktywności GGTP w surowicy krwi u tego gatunku płaza w cyklu rocznym. W związku z powyższym, jak również uwzględniając fakt, że GGTP uczestniczy w rozkładzie glutationu, interesujące wydaje się pytanie, jak na tle zmian poziomu glutationu będzie zmieniała się aktywność GGTP w surowicy krwi u *Rana temporaria* L. w ciągu roku.

MATERIAŁ I METODYKA BADAŃ

Badania przeprowadzono na 110 samicach i 110 samcach *Rana temporaria* L., pochodzących bezpośrednio z ich naturalnego środowiska. Płazy o długości około 7 cm łowiono w każdym miesiącu, oprócz sierpnia, z uwzględnieniem ich charakterystycznych okresów w ciągu roku, mianowicie pory godowej, życia aktywnego na lądzie i hibernacji.

Po dekapitacji pobierano krew bezpośrednio z serca w celu uzyskania surowicy, którą w dalszej kolejności przeznaczano do oznaczania aktywności GGTP. GGTP oznaczano metodą Orłowskiego i Szewczuka (1961), stosując zestawy produkowane przez Wytwórnię Surowic i Szczepionek w Krakowie. Zasada metody polega na przeprowadzeniu reakcji enzymatycznej, w czasie której pod wpływem GGTP uwalnia się z γ -L-glutamilo-alfa-naftyloamidu alfa-naftyloamina, którą oznacza się kolorymetrycznie, po przerwaniu reakcji enzymatycznej i wywołaniu barwy przy pomocy p-dwumetyloaminoben-

zaldehydu. Natężenie barwy związku alfa-naftyloaminy z p-dwumetyloamino-benzaldehydem jest proporcjonalne do stężenia uwolnionej w czasie reakcji alfa-naftyloaminy, a stężenie to jest z kolei proporcjonalne do aktywności GGTP w badanej próbce.

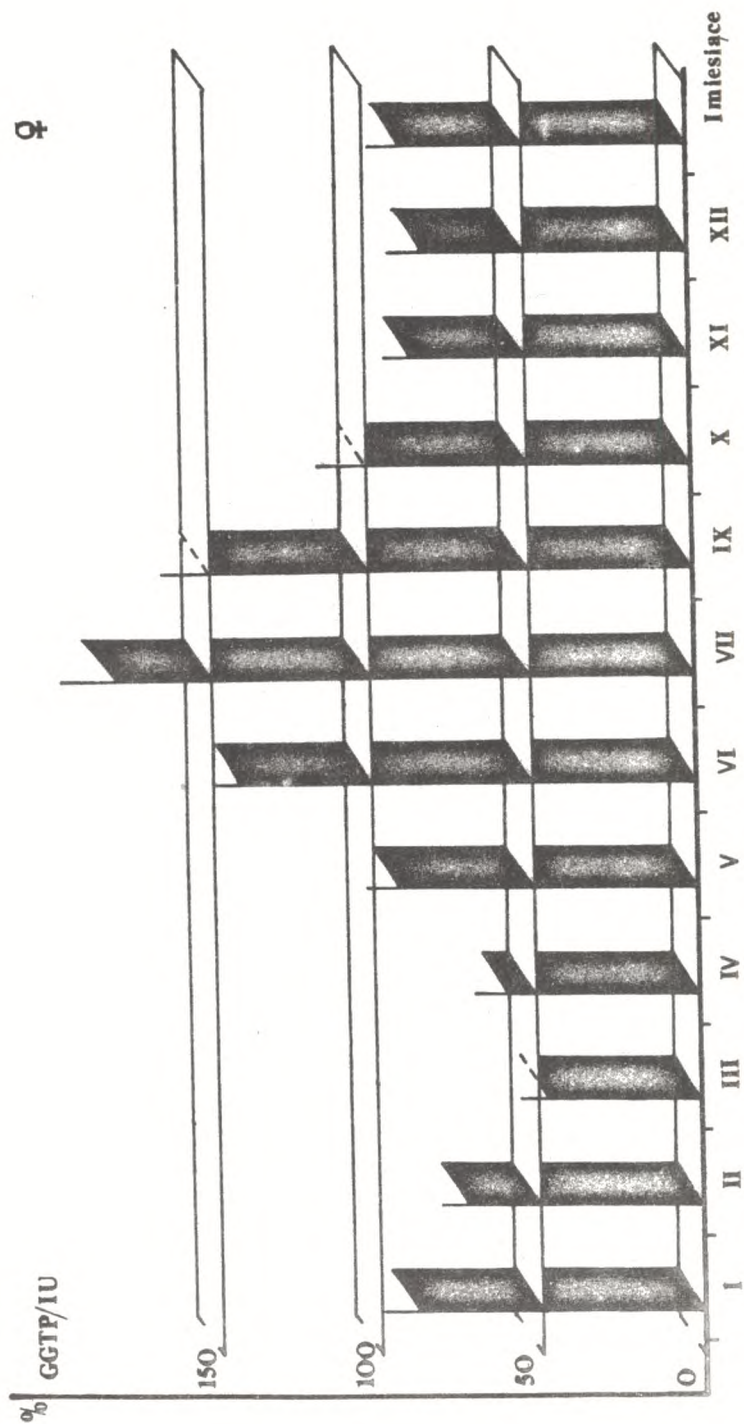
Do oznaczeń aktywności GGTP używano surowic świeżo odwirowanych, w których po przerwaniu reakcji enzymatycznych mierzono ekstynkcje przy długości fali 440 nm, w kuwetach o szerokości 1 cm. Aktywność GGTP podano w jednostkach międzynarodowych (IU). Z uzyskanych danych wyliczono średnie arytmetyczne i odchylenia standardowe. W celu stwierdzenia, czy zmiany aktywności GGTP, pomiędzy samcami i samicami w poszczególnych okresach są statystycznie istotne, zastosowano test "t". Natomiast w celu wykazania, czy uzyskane zmiany są statystycznie istotne w ciągu roku, posłużono się testem F_0 .

WYNIKI

Wszystkie dane liczbowe zestawiono w tab. 1 oraz zilustrowano na ryc. 1 i 2. W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono minimum aktywności GGTP w surowicy krwi samic i samców *Rana temporaria* L. w marcu, bezpośrednio przed okresem pory godowej, Maksimum zaś aktywności badanego enzymu wykazano w lipcu, tj. środkowym okresie życia aktywnego płazów na lądzie. Nie wykazano różnic statystycznie istotnych pomiędzy samicami i samcami w okresie życia aktywnego płazów na lądzie, z wyjątkiem okresu hibernacji. Wykazano natomiast, że średnie wartości obrazujące zmiany aktywności GGTP u obu płci są wyraźnie statystycznie istotne w ciągu roku. Stwierdzono także wyższą aktywność GGTP u samic.

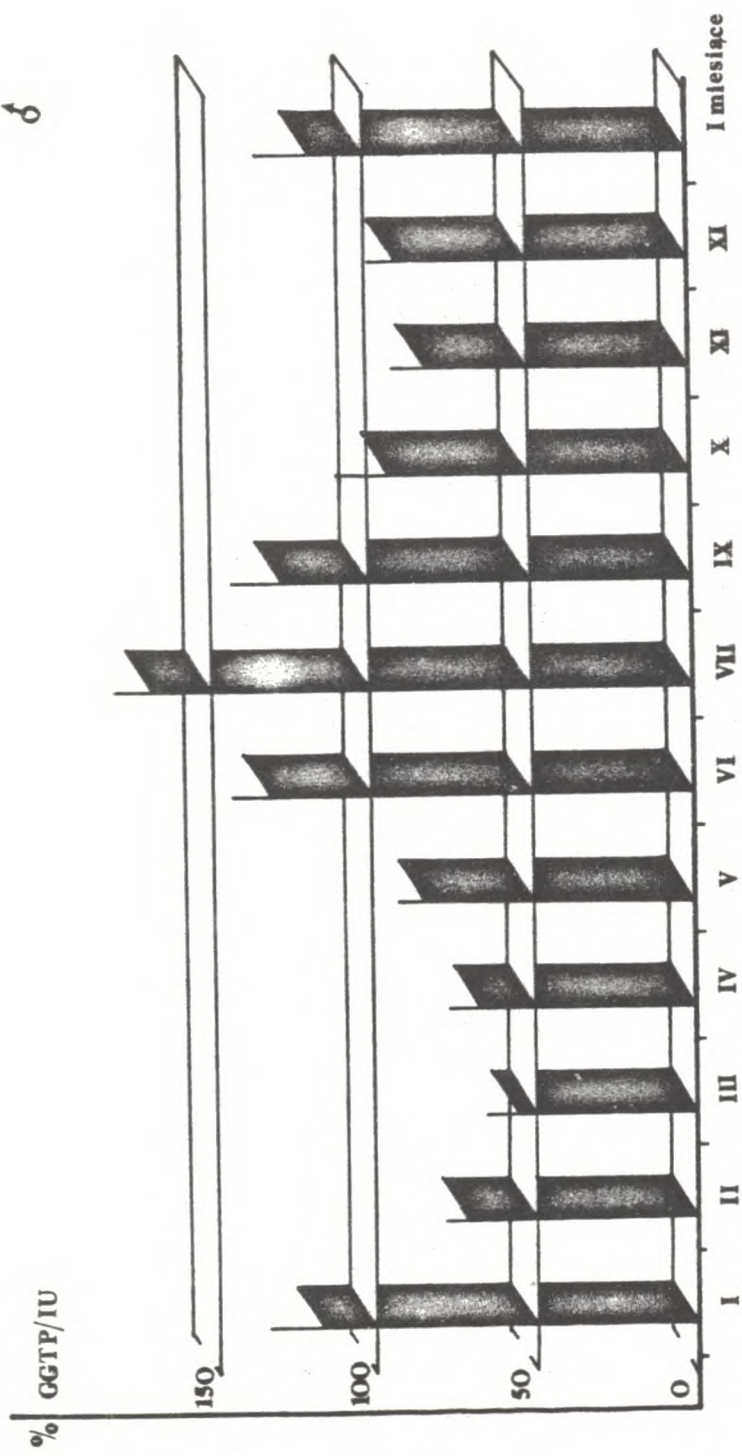
DYSKUSJA

Wykazano zmiany aktywności GGTP w surowicy krwi *Rana temporaria* L. w cyklu rocznym. Małą aktywność badanego enzymu stwierdzono generalnie w okresie hibernacji, z minimum w marcu, tj. w końcowym okresie hiber-



Ryc. 1. Zmiany aktywności γ -glutamylotranspeptydazy w surowicy krwi samic *R. temporaria* L. w cyklu rocznym

♂



Ryc. 2. Zmiany aktywności γ -glutamylotranspeptydazy w surowicy krwi samców R. temporaria L. w cyklu rocznym

Tabela 1

Zmiany aktywności γ - glutamylotranspeptydazy w surowicy krwi samic i samców Rana temporaria L. w cyklu rocznym

Płeć	Średnia ilość γ - glutamylotranspeptydazy w IU/l												F ₀
	Miesiące												
	I	II	III	IV	V	VI	VII	IX	X	XI	XII		
♀	3,0016 ±0,497	2,4119 ±0,163	1,52924 ±0,214	1,79952 ±0,255	2,29812 ±0,209	3,57692 ±0,297	4,58436 ±0,313	3,57703 ±0,362	2,49608 ±0,370	2,23796 ±0,246	2,44240 ±0,203	41,776 ^x	
♂	2,1609 ±0,258	1,7675 ±0,152	1,6752 ±0,157	1,43384 ±0,200	2,27884 ±0,243	3,48224 ±0,204	4,42120 ±0,395	3,70098 ±0,351	2,47104 ±0,330	2,1084 ±0,193	2,0083 ±0,253	152,970 ^x	
"t"	47,76 ^x	29,29 ^x	5,61 ^x	11,42 ^x	0,62	2,70	3,26	1,03	1,62	4,29	13,56 ^x		

W każdym okresie badawczym analizowano po 10 samic i samców.

x - statystycznie istotne przy P < 0,001.

nacji, zaś wyraźnie wyższą aktywność GGTP w okresie życia aktywnego płażów na lądzie, z maksimum w lipcu, czyli w środkowym okresie życia aktywnego.

W okresie hibernacji płaży przebywają w niskich temperaturach otoczenia (około 4⁰C) oraz nie pobierają pokarmu, co u zwierząt poikilotermicznych zawsze ogranicza ich metabolizm (Poczopko i Jusiak, 1972). Istnieje więc wtedy małe zapotrzebowanie organizmu na GGTP, enzym, który katalizuje przenoszenie aminokwasów ze środowiska pozakomórkowego do wnętrza komórki (Meister, 1984).

Kiedy podnosi się temperatura otoczenia, płaży zaczynają się odżywiać i zaczyna wzrastać ich aktywność metaboliczna. Maksimum tej aktywności przypada na lipiec, kiedy płaży przebywają w temperaturach otoczenia sięgających średnio 22⁰C. W tym czasie istnieje duże zapotrzebowanie komórek na aminokwasy, a tym samym na ich znaczną translokację poprzez błony komórkowe, która dokonuje się, jak już wcześniej wspomniano, przy udziale GGTP. Tak więc stwierdzona wysoka aktywność badanego enzymu w okresie życia aktywnego płażów na lądzie wydaje się być uzasadniona.

Wykazano również wyższą aktywność GGTP u samic niż u samców. Podobne różnice płciowe dotyczące aktywności tego enzymu wykazali w wątrobie szczurów Igarashi i inni (1983, 1984). Autorzy ci są zdania, że różnice te są uwarunkowane poziomem estradiolu, gdyż podawanie tego hormonu zwierzętom kontrolnym zawsze powoduje wzrost aktywności GGTP. Być może, że również u *Rana temporaria* L. stwierdzone różnice płciowe w aktywności GGTP są wywołane tak, jak w przypadku szczurów zmianami poziomu estradiolu wynikającymi z różnic płciowych. Sugestię tę potwierdzałby fakt, że wykazane różnice w aktywności GGTP pomiędzy samicami i samcami są znaczne w okresie hibernacji, a więc w czasie bezpośrednio poprzedzającym owulację i składanie jaj.

Interesujący jest fakt, że u tego samego gatunku w krwi wystąpiła, podobnie jak w przypadku GGTP, mała ilość glutationu w okresie hibernacji, a zdecydowanie wyższa w okresie życia aktywnego płażów na lądzie.

Uzyskane dane wyraźnie sugerują, że poziom glutationu w normalnych warunkach środowiskowych jest limitowany zarówno aktywnością enzymów uczestniczących w jego syntezie, a więc aktywnością γ -glutamylcysteino-

wej syntetazy, jak i glutationowej syntetazy (Meister, 1974; Snoke i Bloch, 1954), jak również aktywnością GGTP, enzymu uczestniczącego w jego rozkładzie.

W konkluzji należy stwierdzić, że aktywność GGTP zmienia się w ciągu roku, wykazując dodatnią korelację ze zmianami poziomu glutationu i z temperaturą otoczenia. Założony więc cel badań został osiągnięty.

Literatura

- Albert Z., Orłowski M., Rzucidło Z., Orłowska J., 1966. Studies on γ -glutamyl transpeptidase activity and histochemical localization in the central nervous system of man and different animal species. Acta histochem. 25: 312-320.
- Anderson M. E., Bridges R. J., Meister A., 1980. Direct evidence inter-organ transport of glutathione and that the non-filtration renal mechanism for glutathione utilization involves γ -glutamyltranspeptidase. Biochem. Biophys. Res. Commun. 96: 848-853.
- Dziubek K., 1987. Glutathione metabolism in selected organs of *Rana temporaria* L. in the annual cycle and under different stresses. Part. I. Dehydration effects. Acta Biol. Cracov. ser. zool. 29, 31-53.
- Igrashi T., Satoh T., Ueno K., Kitagawa H., 1983. Sex-related difference in the hepatic glutathione level and related enzyme activities in rat. J. Biochem. 93, 33-36.
- Lisy V., Stastny F., Sedlacek J., 1981. Development formation and cortisol regulation of gamma-glutamyl transpeptidase in brain and spinal cord of chick embryo. Develop. Neuroscience 4, 401-407.
- Matsuda Y., Tsuji A., Kuno T., Katunuma N., 1983. Biosynthesis and degradation of γ -glutamyltranspeptidase of rat kidney. J. Biochem. 94, 755-765.
- Meister A., 1973. On the enzymology of amino acid transport. Science 180, 33-39.
- Meister A., 1974. Glutathione synthesis (Boyer P.D.ed.). The enzymes vol. 10, 671-697. New York: Academic.

- Meister A., 1974. New aspects of glutathione biochemistry and transport: selective alteration of glutathione metabolism. Federation Proceedings. Vol. 43, 3031-3042.
- Meister A., Tate S. S., Ross L. L., 1976. Membrane-bound γ -glutamyl transpeptidase, In: Martonosi (ed.): The enzymes of biological membranes, vol. 3, pp. 315-347. Plenum Press Corp., New York.
- Orłowski M., Szewczuk A., 1961. Colorimetric determination of γ -glutamyl-transpeptidase activity in human serum and tissues with synthetic substrates. Acta Bioch. Pol. 8, 189.
- Poczopko P., Jusiak R., 1972. The effect of ambient temperature and season on total and tissue metabolism of the frog (*Rana esculenta* L.). Bull. Acad. Polon. Sci., ser. Sci. Biol. 6, 437-441.
- Shine H. D., Haber B., 1981. Immunocytochemical localization of gamma-glutamyl transpeptidase in the rat CNS. Brain Res. 217, 339-349.
- Snoke J. E., Bloch K., 1954. Biosynthesis of glutathione. (Colowick S., Lazarow A., Racker E., Schwarz D. R., Stadtman E., Waelsch H., eds). Glutathione pp. 129-137. New York: Academic.
- Tate S. S., 1980. Enzymatic basis of detoxication (Jakoby W. B., ed.). Vol. 2. p. 15. Academic Press, New York.
- Von Rudel J., Warzok E., 1984. Histochemische, biochemische und mikroelektrophoretische Untersuchungen der γ -Glutamyltranspeptidase im Zentralnervensystem der Ratte. Acta histochemica. Suppl.-Band 30, 327-335.

CHANGES OF THE ACTIVITY OF γ - GLUTAMYL TRANSPEPTIDASE (GGTP)
IN THE BLOOD SERUM OF *RANA TEMPORARIA* L.
DURING THE ANNUAL CYCLE

Summary

In this work it was determined the activity of GGTP in the blood serum of adult males and females *Rana temporaria* L. which were taken just from their natural habitat.

It is noted that the activity of the studied enzyme is low during hibernation and correspondingly higher during their active life on land. It is also noted that the activity of GGTP is higher in females than in males.

In this work it is also discussed the problem of the relation between the activity of GGTP - the enzyme causing degradation of the glutathione and the level of the glutathione. Because it seems that the activity of GGTP is distinctly correlated to the processes of the glutathione synthesis.

Кароль Дзюбэк

Изменения активности ГГТП в сыворотке крови

Rana temporaria L. в годичном цикле

Резюме

Было обозначено количество ГГТП в сыворотке крови у половозрелых самок и самцов *Rana temporaria* L., взятых непосредственно из их натуральной среды. Была отмечена небольшая активность исследуемого энзима в период гибернации, но соответственно выше в период их активной жизни на суше. Была отмечена высшая активность ГГТП у самок чем у самцов.

В этой работе обсуждается также проблема зависимости между активностью ГГТП и энзимом, вызывающим деградацию глутатена. Кажется, что активность ГГТП четко связана с процессами синтеза глутатена.