

BARBARA NAGÓRNA-STASIAK, AGNIESZKA ŁAZUGA-ADAMCZYK

Wpływ witaminy C na aktywność alfa-amylazy u królików

Zakład Fizjologii Zwierząt Instytutu Nauk Fizjologicznych Wydziału Weterynaryjnego AR,
ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin

Summary

The effect of vitamin C on the activity of alpha-amylase in rabbits

The effect of vitamin C on the activity of alpha-amylase of plasma and tissues was examined on 25 rabbits. The activity of alpha-amylase was determined by the method of Caraway and vitamin C by the method of Roe-Kuethner. It was found that sorbic acid increases the activity of alpha-amylase in pancreas by 12.5%, in parathyroid glands by 5.2%, in liver by 92.3%, in duodenum by 18.7% and in jejunum by 11.1%. The initial decrease of plasma activity of alpha-amylase from 4866 u/l to 4142 u/l coincided with an increase of the content of vitamin C from 14.2 μmol/l to 287.0 μmol/l. After 24 h since the application of vitamin C when plasma level of vitamin C lowered to an initial value the activity of alpha-amylase increased to 8156 u/l.

The application of vitamin C in substantia or food containing high concentration of this vitamin may give some unexpected results. Alterations in alpha-amylase activity by vitamin C may play a valid role when the activity of this enzyme is determined for diagnostic purposes.

Alfa-amylaza jest enzymem trawiącym skrobię i produkowana jest przez wiele narządów: trzustkę, przyusznice, ściany jelit, a również przez leukocyty. Izoenzymy alfa-amylazy pochodzenia trzustkowego zakwalifikowano do typu P, zaś śliniankowego do typu S, którego biosynteza odbywa się też w ścianie jelit i wielu innych narządach (12). Na tej podstawie przyjęto, że alfa-amylaza obecna we krwi jest pochodzenia zarówno śliniankowego, jak i trzustkowego (5). We krwi są również izoenzymy alfa-amylazy, które nie pochodzą z tkanek i różnią się między sobą termolabilnością. Jest to alfa-amylaza pochodzenia leukocytarnego, która przeciwnie niż tkankowa w temperaturze 65°C nie traci swojej aktywności. Dlatego też alfa-amylazę pochodzenia leukocytarnego nazwano termostabilną, w odróżnieniu od trzustkowej i śliniankowej, zwanej termolabilną (3, 13).

Znane są substancje, które dają wzrost aktywności alfa-amylazy w ustroju; jest to np. izoproterenol, czy też monenzin, które poprzez łączne działanie jonów sodowych i wapniowych stymulują uwalnianie amylazy z tkanek (11).

Mało jest znany wpływ witaminy C na aktywność enzymów u człowieka i zwierząt. Niemniej wykazano, że kwas askorbowy daje wzrost aktywności kwaśnej i alkalicznej faszfatazy w szpiku kostnym i osoczu (8). Jest ona również czynnikiem wpływającym na transketolazę i aminotransferazy w erytrocytach, uczynnia też adenylocyklazę i powoduje wzrost koncentracji cAMP w komórkach (4, 6).

W poprzedniej naszej pracy określono aktywność alfa-amylazy w osoczu i tkankach królików oraz wykazano istnienie dziennych wahań aktywności tego enzymu. Stwierdzono również, że witamina C w zależności od dawki może powodować wzrost lub spadek alfa-amylazy (7).

Celem niniejszej pracy było określenie wpływu witaminy C w wyższych stężeniach na aktywność alfa-

-amylazy w ustroju oraz obserwacja aktywności po 24 godzinach od podania kwasu askorbowego, jak też wykazanie, czy witamina ta wpływa na zmianę proporcji między amylazą termostabilną i termolabilną.

Materiał i metody

Badania wykonano na 25 królikach o masie ciała 4–5 kg, pochodzących z jednej hodowli. Króliki otrzymywały siano i mieszankę granulowaną LSK oraz wodę w godzinach 8.00 i 12.00. Królikom w trakcie doświadczeń podawano dootrzewnowo płyn fizjologiczny w ilości 2 ml lub 200, 300 i 500 mg/kg witaminy C (kwasu askorbowego) rozpuszczonej w 2 ml płynu fizjologicznego. W zależności od podanej substancji wyniki badań były zaliczane do grupy kontrolnej lub doświadczałnej. Krew do badań pobierano z żyły usznej przedniej, następnie podawano witaminę C i ponownie pobierano krew do analizy po 1, 3 i 24 godzinach.

Aktywność alfa-amylazy oznaczano w osoczu metodą Caraway'a (2). Otrzymaną aktywność w jednostkach Somogyi/100 ml przeliczano na zalecane przez SI jednostki U/l. Witaminę C w osoczu oznaczano metodą Roe-Kuethnera (9, 10). Na zakończenie doświadczeń zglądano króliki po 3 godzinach od podania płynu fizjologicznego lub 500 mg/kg witaminy C, a następnie oznaczano aktywność alfa-amylazy w przyspiznicy, trzustce, wątrobie, ścianie dwunastnicy i jelita czczego. Otrzymany wynik w jednostkach Somogyi/100 ml homogenatu przeliczano na gram świeżej tkanki. Następnie jednostki Somogyi zamieniono na U/g tkanki wg SI. W osoczu i tkankach określono również aktywność amylazy termolabilnej przez oznaczenie aktywności amylazy termostabilnej (nie traciła aktywności po podgrzaniu do temp. 65°C przez 15 min.) i odjęciu od amylazy całkowitej (3, 13).

W doświadczeniach używano kwasu askorbowego „Pofa”. Wyniki poddano analizie statystycznej przy pomocy testu t-Studenta.

Wyniki i omówienie

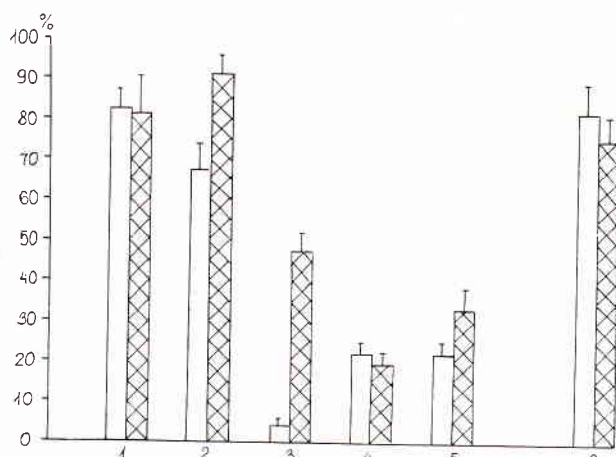
U królików, którym podawano płyn fizjologiczny zaobserwowano niewielkie dzienne wahania aktywności alfa-amylazy. Wzrost aktywności wystąpił w godzinach południowych, a następnie aktywność obniżała się i po 24 godzinach przyjmowała wartość wyjściową (tab. 1). Podanie 200 mg/kg wagi witaminy C spowodowało po chwilowym wzroście aktywności, po 3 godzinach znaczny jej spadek, bo z 4919 U/l do 3829 U/l z jednoczesnym wzrostem w osoczu stężenia witaminy C z 13,1 do 156,2 μmol/l. Po 24 godzinach od podania kwasu askorbowego w ilości 200 mg/kg nastąpił bardzo wyraźny i wysoce istotny wzrost aktywności alfa-amylazy w osoczu, bo dochodzący do 7230 U/l. Jednocześnie poziom witaminy C powrócił do normy. Wyższe stężenia witaminy C, a więc 300 i 500 mg/kg, już po 1 godzinie od podania witaminy obniżyły aktywność enzymu w osoczu, która najwyraźniej wystąpiła po 3 godzinach, obniżając się z 4489 do 4071 U/l i z 4866 do 4142 U/l. Obniżeniu aktywności alfa-amylazy towarzyszył wzrost stężenia witaminy C w osoczu. Jednakże po 24 godzinach od podania witaminy w dawce 300 lub 500 mg/kg, obserwowano duży wzrost aktywności enzymu w osoczu, bo aż do 7949 i 8156 U/l, z jednoczesnym powrotem do normy poziomu kwasu askorbowego (tab. 1).

Po 3 godzinach od podania 500 mg/kg witaminy C aktywność alfa-amylazy w tkankach znacznie wzrosła (tab. 2). Wzrost aktywności obserwowano w trzu-

Tab. 1. Aktywność alfa-amylazy (U/l) oraz poziom witaminy C ($\mu\text{mol/l}$) w osoczu królików przed i po podaniu witaminy C ($\bar{x} \pm s$, $n = 30$)

Podana substancja	Osocze	Przed podaniem wit. C		Po podaniu wit. C (godz.)					
		1	3	1	3	24	1	3	24
Płyn fizjologiczny	amylaza wit. C	4397 10,2	185,0 0,28 a	4490 10,2	186,0 0,28 a	4680 7,4	182,0 0,26 b	4235 10,6	126,0 0,30 a
Witamina C 200 mg/kg	amylaza wit. C	4919 13,1	136,0 0,42 a	5084 198,7	178,0 7,3 b	3829 156,2	124,0 6,3 c	7230 14,1	171,0 0,32 a
Witamina C 300 mg/kg	amylaza wit. C	4489 15,0	120,0 0,70 a	4185 221,3	156,0 8,2 b	4071 196,0	115,0 6,4 c	7949 17,2	283,0 0,95 a
Witamina C 500 mg/kg	amylaza wit. C	4866 14,3	136,0 0,76 a	4240 316,4	116,0 12,3 b	4142 287,0	153,0 12,8 b	8156 15,5	212,0 0,47 a

Objaśnienie: a, b, c — średnie oznaczone różnymi literami różnią się istotnie w kierunku poziomym przy $p \leq 0,05$.



Procent amylazy termolabilnej w tkankach i osoczu \square przed, \boxtimes po podaniu 500 mg/kg witaminy C 1-trzustka, 2-przyusznica, 3-wątroba, 4-dwunastnica, 5-jelito czcze, 6-osocze * — różnice istotne statystycznie przy $p \leq 0,05$, $n = 15$

Ryc. 1.

stce o 12,5%, przyusznicy o 5,2%, wątrobie o 92,3%, w dwunastnicy o 18,7% i jelicie czczym o 11,1%. Ten wzrost aktywności alfa-amylazy w tkankach był obserwowany z jednoczesnym obniżeniem jej aktywności w osoczu, ale wzrostem poziomu witaminy C.

Jednocześnie oznaczono procent amylazy pochodzenia tkankowego — termolabilnej w osoczu i tkankach przed i po podaniu 500 mg/kg witaminy C. Okazało się, że amylaza termolabilna wzrosła w przyusznicy z 65 do 92%, w wątrobie z 5 do 46%, jelicie czczym z 22 do 33%. Poziom jej nie uległ istotnej różnicy w trzustce, dwunastnicy i osoczu (ryc. 1). Pozostała część alfa-amylazy (do 100%), zwana amylazą termostabilną, była pochodzenia leukocytarnego.

Jak wynika z przeprowadzonych doświadczeń, witamina C powoduje w pierwszych godzinach, kiedy stężenie jej w osoczu jest wysokie, znaczny spadek aktywności alfa-amylazy we krwi. Dopiero po 24 godzinach, gdy poziom witaminy C wraca do normy, następuje gwałtowny wzrost aktywności alfa-amylazy, który jest związany — jak należy przypuszczać — ze znacznym jej wyrzutem z narządów, gdyż aktywność tego enzymu w tkankach wzrastała bardzo wyraźnie po podaniu witaminy.

Wzrost lub spadek aktywności alfa-amylazy w osoczu i tkankach pod wpływem witaminy C może być związany z czynnością jonów sodu, wapnia, czy też chloru w organizmie. Takie działanie na aktywność alfa-amylazy wywiera np. izoproterenol, czy też mo-

Tab. 2. Aktywność alfa-amylazy (U/g) w tkankach królików przed i po podaniu 500 mg/kg witaminy C ($\bar{x} \pm s$, $n = 28$)

Tkanka	Aktywność alfa-amylazy			
	przed podaniem witaminy C		3 godz. po podaniu witaminy C	
Trzustka	294,8	5,8 a	332,1	9,6 b
Przyusznica	375,2	3,6 a	394,9	4,5 b
Wątroba	30,2	2,5 a	57,7	4,2 b
Dwunastnica	52,9	2,9 a	62,8	3,7 b
Jelito czcze	67,5	3,5 a	75,0	3,9 a

Objaśnienie: jak w tab. 1.

nenzin, które uruchamiają wapń z wewnętrznych zapasów, dając wzrost aktywności alfa-amylazy w ustroju (11). Wpływ witaminy C na aktywność alfa-amylazy już został zaobserwowany (7). Również takie enzymy, jak: kwaśna i alkaliczna fosfataza, transketolaza i aminotransferaza oraz adenylocyklaza zmieniają swą aktywność pod wpływem kwasu askorbowego (4, 6, 8).

U królików amylaza termolabilna — tkankowa w osoczu stanowi 82% (1, 3, 5, 12, 13), u człowieka zaś 27—44%, zwiększając się do około 84% w stanach zapalnych trzustki lub przyusznicy (3, 13).

Badania nad podziałem amylazy na termolabilną i termostabilną prowadzone na osoczu człowieka w pełni wykazują przydatność testu termolabilności w jej określaniu, gdyż wyniki potwierdzają dane uzyskane w rozdziale elektroforetycznym (3, 13).

Jak wykazano witamina C nie jest obojętna dla aktywności enzymu trawiącego węglowodany — alfa-amylazy. W pierwszych godzinach powoduje spadek aktywności w osoczu, a wzrost w tkankach, zaś po 24 godzinach — następował wyrzut alfa-amylazy do krwi i wzrost jej aktywności w osoczu. Jednocześnie zmieniały się proporcje między amylazą tkankową — termolabilną i leukocytarną — termostabilną.

Wnioski

1. Witamina C powoduje wzrost aktywności alfa-amylazy w tkankach oraz początkowe obniżenie, a następnie wzrost aktywności w osoczu.

2. Po witaminie C wzrasta aktywność alfa-amylazy termolabilnej w przyusznicy, wątrobie i ścianie jelita czczego.

3. Przy podawaniu witaminy C w celach zapobiegawczych lub leczniczych w substancji lub z pokarmem, należy liczyć się z szerszymi niż zamierzone skutkami, które może ona spowodować; zjawisko to może mieć duże znaczenie przy oznaczaniu aktywności alfa-amylazy.

lasy w celach diagnostycznych, np. przy zapaleniu trzustki.

Piśmiennictwo

1. Berk J., Hayasaki S., Searey R., Hightower N.: Am. J. digest. Dis. 11, 696, 1966.
2. Caraway W.: Am. J. clin. Pathol. 32, 97, 1959.
3. Donaldson L., Intosh W., Brodie M.: Scand. J. Gastroent. 12, 637, 1977.
4. Hanck A., Weiser B.: Int. J. Vitam. Nutr. Res. 43, 483, 1979.

5. Karn R., Wise R., Merritt D.: Arch. Biochem. Biophys. 175, 144, 1976.
6. Levin S.: Vitamin C. Academic Press, London, 1976, s. 75—101.
7. Nagórna-Stasiak B., Łazuga-Adameczyk A., Kołodyńska M.: Acta Physiol. Pol. 1, 15, 1987.
8. Olaj M., Adward D., Abu-Zied I.: Acta Histochem. 46, 186, 1973.
9. Roe J., Kuethner C.: J. biol. Chem. 47, 399, 1943.
10. Roe J.: Ann. N. Y. Acad. Sci. 92, 277, 1961.
11. Warshaw A.: J. Surg. Res. 16, 360, 1974.
12. Vinicer F.: Ann. Intern. Med. 31, 200, 1979.
13. Zakrzewska I., Prokopowicz J.: Pol. Tyg. Lek. 37, 643, 1982.

Adres autora: prof. dr hab. Barbara Nagórna-Stasiak, ul. Tomowicza 4/24, 20-073 Lublin

Z HISTORII WETERYNARII

ANDRZEJ SKROBACKI
Olsztyn

Współpraca Roberta Kocha z polskim aptekarzem z Wolsztyna w okresie jego pracy na stanowisku fizyka powiatowego

Wybitny uczony — lekarz i bakteriolog Robert Koch przez wiele lat związał swój los z dwoma miasteczkami w Pozańskim: Rokoniewiczami i Wolsztynem. Pobyt w Rokoniewiczach przerwała wojna francusko-pruska lat 1870—1871, na którą Koch wybrał się jako ochotnik w charakterze lekarza. Skierowany został najpierw do 11 Lazaretu Polowego X Armii, który w czasie bitwy o Metz znajdował się w St. Privat; później przeniesiono go do lazaretu dla chorych na dur w Neuf-Chateau (1). W wyniku reklamowania wrócił na swoje poprzednie stanowisko do Rokoniewicz. Po złożeniu egzaminu na fizyka powiatowego 19 kwietnia 1872 r. (mając 29 lat) otrzymał fizyka powiatu babińskiego z siedzibą w Wolsztynie. Tutaj też w ciągu następnych ośmiu lat rozwijał działalność lekarską i naukową.

O kontaktach Roberta Kocha z mieszkańcami Wolsztyna, z Polakami, świadczą m.in. dwa listy odnalezione w Centralnym Archiwum Państwowym w Merseburgu (2). Autorem listów jest radca medyczny dr Brinkmann z Wolsztyna, który informował swoich przełożonych o sprzecznościach laboratoryjnym pozostawionym przez dr Roberta Kocha w miejscowej aptece.

Oto treść pierwszego listu, datowanego 11 września 1905 r.:

„Dr Brinkmann, Radca medyczny. Wolsztyn, 11 IX 1905
Jaśnie Wielmożny Panie, Wielce Szanowny Panie Tajny Nadradco Medyczny!

W tutejszej aptece, która z dniem 1 października przechodzi z polskich rąk w niemieckie, zdaniem jej wcześniejszej właścicielki wdowy Walerii Knechtel znajdują się pierwsze mikroskopy, jak i szereg odręcznych rysunków Roberta Kocha z czasów, gdy bakteriologia była jeszcze w powijakach. Rzeczy tych nie widziałem, nie potrafię więc ocenić ich wartości. W każdym razie dla historii bakteriologii mogą okazać się nie bez znaczenia. Dawny właściciel Knechtel dostarczył swego czasu Kochowi mikroskopy, gdyż on nie posiadał na to środków, a także początkowo z nim współpracował. Gdyby Pan nosił się z zamiarem zdobycia owych przedmiotów dla bakteriologicznego muzeum, to teraz byłaby właściwa hora, zanim nie ulegną one zmarowaniu. A może mam je wstępnie sam zobaczyć? Oczywiście, byłoby o wiele lepiej, gdyby Pan tu dotarł i wszystko obejrzał osobiście. Proszę mi najlaskawiej wybaczyć, iż tym Pana obarczam, ale byłem jednak przekonany, że trzeba tę niecierpiącą zwłoki sprawę Panu przekazać. Z zapewnieniem szczególnego szacunku, zawsze Jaśnie Wielmożnemu Panu oddany

Dr Brinkmann”

Jeszcze ciekawszy jest drugi list dr Brinkmanna, datowany w Wolsztynie 20 września 1905 r.* Dowiadujemy się z niego o jaki sprzęt laboratoryjny chodziło i jak przedstawiała się współpraca naukowa pomiędzy Robertem Ko-

* U góry listu widnieje odręczna notatka: „Odpowiedź tymczasowa a. 30. IX. Zapytanie do Gaffky'ego 6. X. Spowodować odpowiedź (dla) pani Knechtel w podaniu do Pana Ministra (?) zaofiarować dar z uwzględnieniem jej życzenia”.

chem a aptekarzem Józefem Knechtelem. Oto jego treść (wielokropek oznacza wyraz nieczytelny):

„Dr Brinkmann, Radca medyczny. Wolsztyn, 20 IX 1905
Jaśnie Wielmożny Panie, Wielce Szanowny Panie Tajny Nadradco Medyczny!

Na Pana uprzejme pismo mogę dzisiaj z radością odpowiedzieć, że Pani Knechtel wszystkie przedmioty, pochodzące z czasów Kocha, chętnie przekaże w formie darowizny. Są to: wielki mikroskop jenajski, aparat z soczewkami, prawdopodobnie do fotografowania preparatów, nie-liczne preparaty z wąglikiem i durem powrotnym, a ponadto olbrzymi zbiór okrzemeków ze wszystkich jezior, bajor i stawów powiatu, jak i spoza niego. Zachował się jeszcze stół i dwa krzesła do mikroskopowania. Notatek dotychczas nie udało mi się odnaleźć; przyznać jednak muszę, iż jeszcze niewiele na to poświęciłem czasu. Ponadto jest jeszcze duża kolekcja gotowych, związanych z mikroskopowaniem preparatów, które jednak dla Pana mogą okazać się bez wartości. Wszystko to, jak powiedziano, Pani Knechtel w formie darowizny oddaje do dyspozycji, pod tym jednak warunkiem, iż przy jakiejś ewentualnie wystawie uwzględni się nazwisko jej zmarłego męża. Co zaś tyczy się jego udziału w pracy umysłowej Kocha, to pozwoliłem już sobie zaznaczyć, że Koch sam nigdy nie byłby w stanie (... zdobyć? sprawić sobie?) mikroskopów i podobnych rzeczy. Prawdopodobnie z badania okrzemek przeszedł do bakterii, gdyż tutejsi ludzie pamiętają go jeszcze, jak zatrzymywał się przy każdej kałuży i zabierał ze sobą szlam i wodę. Zmarły Knechtel wykonał z nim wiele doświadczeń na zwierzętach, lecz wszystkim potrzebny do tego sprzęt oddał Kochowi, o czym mi jeszcze za życia zakomunikował — sam leczyłem go aż do śmierci na chorobę Brighta (chorobę nerek — A. S.). On wogóle niechętnie mówił o swojej pracy z Kochem, prawdopodobnie było mu przykro, iż Koch nigdy o nim nie wspominał. Jest jednak rzeczą pewną i zawsze jeszcze można potwierdzić to zeznaniami świadków, że w badaniach Kocha Knechtel miał główny udział. Poprzedni (... pracownik?) apteki zgodnie z oświadczeniem Pani Knechtel mówił mi, iż obydwaj panowie często całe noce spędzali na mikroskopowaniu i pracy, wzajemnie siebie kontrolując. Jeśli Pan chce te przedmioty otrzymać, to wyślę je Panu i proszę o laskawą informację. W nadziei, iż Pana o wiele za krótki urlop wypadnie dobrze, pozostaję ze szczególnym szacunkiem Jaśnie Wielmożnemu Panu zawsze oddany

Dr Brinkmann”

W poszycie znajdują się jeszcze trzy pisma związane z tą sprawą (3): list dyrektora Instytutu Chorób Zakaźnych w Berlinie prof. dr Georga Gaffky'ego** adresowany do „Wielce Szanownego Pana Kolegi” z 2 października 1905 r., list

** Georg Theodor August Gaffky (1850—1918), od 1914 r. dyrektor Instytutu Chorób Zakaźnych w Berlinie (objął to stanowisko po R. Kochu); pierwszy uzyskał hodowlę zarazków duru brzuszkiego.