

PRESNOVA BELJAKOVIN IN DEJAVNIKI, KI VPLIVAJO NANJO *

Tatjana PIRMAN^{a)}, Jasna M. A. STEKAR^{b)} in Etienne COMBE^{c)}

^{a)} Univ. v Ljubljani, Biotehniška fak., Odd. za zootehniko, Groblje 3, SI-1230 Domžale, Slovenija, mag.

^{b)} Prav tam, prof., dr.

^{c)} INRA, Laboratorij za presnovo dušika, Center Clermont-Ferrand - Theix, F-63122 Saint-Genès-Champanelle, Francija, samostojna raziskovalka

Delo je prispelo 1999-07-28, sprejeto 1999-08-12.

Received July 28, 1999, accepted August 12, 1999.

IZVLEČEK

Ravnovesje med sintezo in cepitvijo beljakovin (obrat beljakovin) uravnava celotno maso beljakovin v telesu. Sintezo novo nastalih beljakovin poteka prek velikega števila zapletenih in ponavljajočih reakcij. Cepitev beljakovin je pomembna za rast in hiranje mišic. V različnih tkivih v telesu so znani trije glavni proteolitični sistemi. Večina metod za merjenje sinteze in razkroja beljakovin temelji na uporabi izotopov. Predstavljamo najpomembnejše dejavnike uravnavanja presnove beljakovin: hormone, substrat, posamezne hranilne snovi v obroku, genetski sestav in starost živali. Najvišjo stopnjo sinteze beljakovin dosežajo tkiva gastrointestinalnega trakta: tanko črevo $103,4 \text{ \% dan}^{-1}$ in debelo črevo $62,1 \text{ \% dan}^{-1}$ ter jetra $105,4 \text{ \% dan}^{-1}$, sledijo periferni organi in tkiva (mišice). Največja masa beljakovin je v skeletnih mišicah. Stopnja sinteze beljakovin v celem telesu mladih podgan doseže vrednosti okoli 30 \% dan^{-1} in pada s starostjo živali.

Ključne besede: beljakovine / presnova / sinteza / razkroj / uravnavanje / podgane

PROTEIN METABOLISM AND INVOLVEMENT OF DIFFERENT FACTORS *

ABSTRACT

The balance between protein synthesis and breakdown (protein turnover) regulates whole - body protein mass. Synthesis of new proteins is achieved by complex series of reactions. Protein breakdown plays a major role in muscle growth and atrophy and in different tissues in body three major proteolytic systems are known. Most methods for quantifying protein synthesis and breakdown are based on isotopic techniques. The most important factors of the regulation of protein metabolism are presented: hormones, substrates, nutrients of the diet, genetic constitution and age of the animal. The highest protein synthesis rate achieve tissues of gastrointestinal tract: small intestine $103.4 \text{ \% day}^{-1}$ and large intestine 62.1 \% day^{-1} , and liver, $105.4 \text{ \% day}^{-1}$ followed by the peripheral tissues (skeletal muscles). Skeletal muscles contain the highest amount of protein. Whole body protein synthesis rate of the young rats is around 30 \% day^{-1} and decreases with age.

Kay words: protein / metabolism / synthesis / degradation / regulation / rats

* Prispevek je del magistrskega dela (zagovor 17. 12. 1996), mentorica prof. dr. Jasna M. A. Stekar, somentorica Etienne Combe, samostojna raziskovalka.

* The article is a part of a master of science thesis (justification 17. 12. 1996), supervisor Prof. Jasna M. A. Stekar, Ph.D., co-advisor Etienne Combe, senior scientist.

UVOD

Ljudje in živali morajo neprestano zauživati beljakovine, ker so tkiva in organi, encimski sistemi, prenosni mehanizmi in mnogi hormoni sestavljeni iz beljakovin. Razlika v masi beljakovin med novorojencem, ki tehta 3,5 kg, in 60 kg težkim odraslim človekom znaša 11 kg. Glede na to je razvidno, da mora hrana, ki jo zauživamo, vsebovati beljakovine. Odrasla oseba pri kateri telesna masa ostaja bolj ali manj nespremenjena, še vedno potrebuje redno oskrbo z beljakovinami, da nadomesti pri dinamičnem ravnotežju v tkivih izgubljene beljakovine. Celotno kroženje beljakovin pri odrasli osebi s povprečno telesno maso znaša okoli 300 g na dan. Od teh se okoli 40 g izgubi dnevno iz telesa in jih je zato potrebno nadomestiti z novimi beljakovinami.

V času rasti, med nosečnostjo (brejostjo), športno dejavnostjo in med okrevanjem telo potrebuje dodatne množine beljakovin. Množina zaužitih beljakovin je večja od izgub in osebek ima tako pozitivno bilanco beljakovin oz. dušika. Med stradanjem ali v času izgub mišične mase pa nastopi negativna bilanca dušika.

Presnova beljakovin je ciklični proces, kjer se beljakovine v tkivih in organih neprestano sintetizirajo in cepijo (Munro, 1970). Med mirovanjem je stopnja sinteze beljakovin enaka stopnji razkroja beljakovin. Zaviranje (inhibicija) sinteze beljakovin povzroči občutno povečanje razpada aminokislin (katabolizem) (Benevenga in sod., 1993).

SINTEZA BELJAKOVIN

Sinteza beljakovin v evkarjontskih celicah je proces, ki ga katalizirajo mnogi encimi in v katerega je vpletena skoraj cela celica. V sam proces so vključene različne vrste ribonukleinskih kislin (RNK), sporočilna RNK (mRNK)¹, prenosna RNK (tRNK)² in ribosomalna RNK (rRNK)³, ki se sintetizirajo v jetrih. Za normalen potek sinteze beljakovin pa so potrebne še aminokislina, aktivirani encimi in energija. Med sintezo beljakovin se aminokislina vežejo z estrsko vezjo na tRNK molekulo. Reakcijo katalizirajo aminoacil-tRNK sintetaze, značilne za vsako od 20 aminokislin.

Ribosomi so sestavljeni iz rRNK in beljakovin in so sestavni del jedra celice. Sestavljeni so iz dveh podenot, manjše 40S in večje 60S podenote, ki med sintezo beljakovin tvorijo 80S ribosome. Pri večini evkarjotskih celic je nekaj ribosomov prostih, nekaj pa je vezanih na mrenico endoplazmatskega retikuluma. V tkivih, ki proizvajajo sekretorne beljakovine, na primer celice jeter in trebušne slinavke, je velik delež ribosomov vezanih na mrenico endoplazmatskega retikuluma. Med prenosom (translacija) se ribosomi premikajo vzdolž mRNK in tvorijo poliribosome ali polisome.

Sinteza beljakovin sestoji iz dveh glavnih stopenj: prepisovanja (transkripcija) in prenosa. Med prepisovanjem nastane mRNK, ki je komplementarna DNK molekuli v celici. Druga stopnja predstavlja reakcije ribosomske sinteze beljakovin po treh stopnjah (slika 1): začetni (initiacija), podaljševalni (elongacija) in končni (terminacija).

V prvi stopnji nastane 80S začetni kompleks, ki ga sestavlja 80S ribosom, začetna tRNK (met-tRNK)⁴ in RNK. V evkarjontskih celicah je poznanih najmanj 9 initacijskih dejavnikov. Nadalje pa je potreben tudi gvanozintrifosfat (GTP). Ribosomi se morajo pred začetno stopnjo ločiti, ker se posamezni podenoti postopoma vežeta na mRNK. V prvem koraku se initacijski dejavnik, GTP in met-tRNK vežejo na podenoto 40S. Za začetek katerekoli sinteze beljakovin je nujna aminokislina metionin. V naslednjem koraku se podenota 40S veže na mRNK in pride na

¹ messenger ribonukleinska kislina

² transfer ribonukleinska kislina

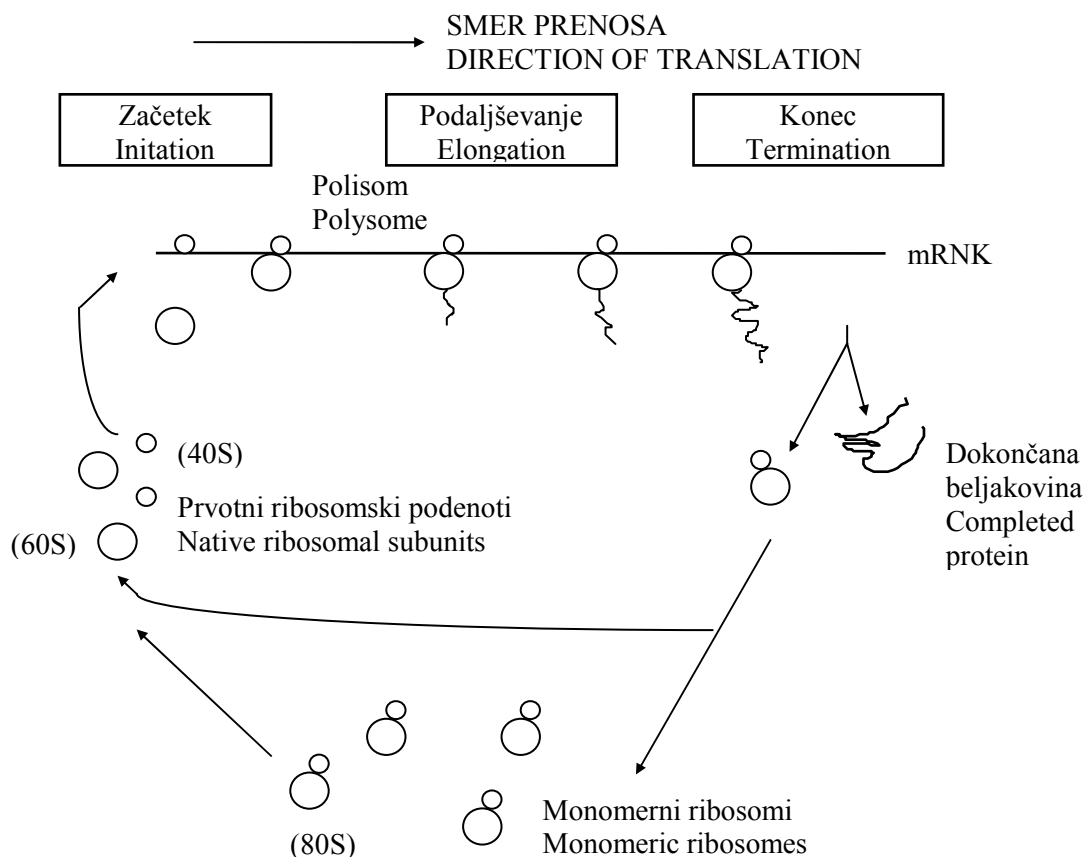
³ ribosomalna ribonukleinska kislina

⁴ metionin vezan na prenosno RNK.

mesto prvega kodona. Zadnji korak v začetni stopnji predstavlja sprostitvev iniciacijskega dejavnika, hidrolizo GTP in vezavo podenote 60S na ribosom. Tako je sedaj 80S začetni kompleks pripravljen za sprejem naslednje aminoacil-tRNK.

Med podaljševanjem verige se ena za drugo ponavljajo tri reakcije:

- nastanek aminoacil-tRNK glede na mRNK kodon
- nastanek peptidne verige
- prestavitev peptidil-tRNK iz mesta A na ribosomu (sprejeta aminoacil-tRNK) na mesto B.



Slika 1. Predstavitev poteka prenosa (prirejeno po Waterlow in sod., 1978).

Figure 1. Diagram of the phases involved in translation (addapted by Waterlow *et al.*, 1978).

Med zadnjo stopnjo ribosomi potujejo vzdolž kodona. Vemo, da sta navzoča dva podaljševalna dejavnika, prvi je navzoč pri nastanku aminoacil-tRNK in drugi pri prestavitvi peptidil-tRNK. Za obe reakciji je potrebna energija v obliki GTP.

Kako poteka zaključek ali terminacija, še ni pojasnjeno v celoti. Konec mRNK signalizira poseben kodon in cela peptidna veriga se sprostí iz tRNK, ravno tako pa se loči ribosom od mRNK. Iz evkarjontskih celic so izolirali tako imenovane sprostitvene dejavnike, ki so očitno nujno potrebni za dokončanje sinteze beljakovin (Lehninger, 1988).

RAZKROJ BELJAKOVIN

Veliko poskusov in študij o razkroju beljakovin je bilo narejenih na skeletnih mišicah. Tako kot tudi druga tkiva sesalcev tudi skeletne mišice vsebujejo raznovrstne proteolitične sisteme, ki po vsej verjetnosti sodelujejo pri razkroju beljakovin. Kot vse kaže, so za cepitev beljakovin v tkivih možne tri glavne poti razkroja.

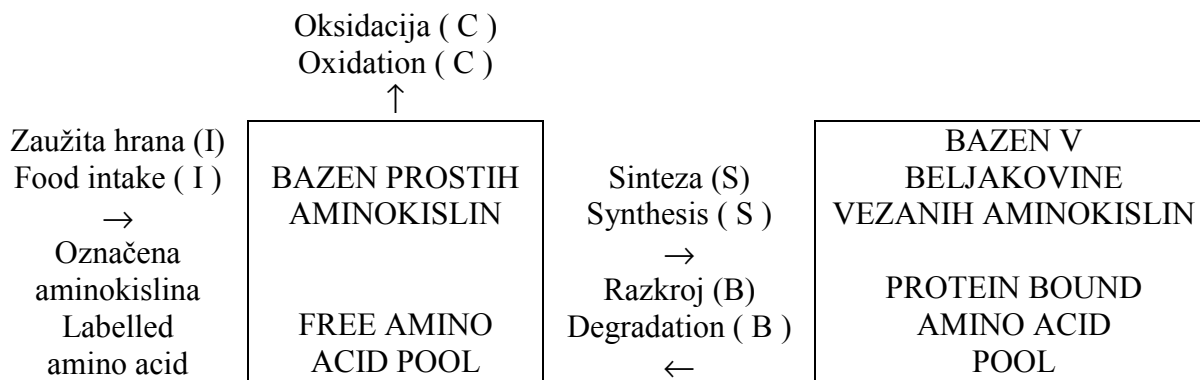
Najbolj znan proteolitični sistem je lizosomalni sistem. Lizosomi so v veliki meri navzoči v jetrih. So celični vključki, ki vsebujejo različne hidrolitične encime, le-ti pa so dejavni le pri kislih pH vrednostih. Lizosomalne endopeptidaze in eksopeptidaze so sposobne hidrolizirati beljakovine do aminokislin. S procesom, ki se imenuje pinocitoza oz. endocitoza so intracelularne beljakovine in organele sposobne hidrolizirati beljakovine, ki vstopajo v celico. To pa poteka v dveh procesih, in sicer po avtofagiji in heterofagiji. Skeletne mišice vsebujejo le malo lizosomov, in mnogi avtorji so v svojih raziskavah ugotovili, da lizosomske proteaze (katepsin B, H, L in D) v normalnih pogojih ne prispevajo veliko k razkroju beljakovin v mišicah.

Najbolj znani nelizosomalni proteazi sta dva od Ca^{2+} – odvisna encima, μ -kalpain in m-kalpain, ki se med seboj razlikujeta po svoji privlačnosti do Ca^{2+} ionov. Od Ca^{2+} odvisni proteolitični proces ne prinese veliko k celotni proteolizi v mišicah. V mišicah so v zadnjem času odkrili še druge kalpaine: n-kalpain oz. p-90, v želodcu in gladkih mišicah pa kalpain z oznako p-94 (Twining, 1994).

Tretja pot, ki so jo odkrili v zadnjem času v mišicah, je od ATP-ubikvitina odvisna pot. Ubikvitin je beljakovina, sestavljena iz 76 aminokislin in se pojavlja pri vseh evkarjontskih organizmih. Ta beljakovina se najprej aktivira s pomočjo ATP in potem s kovalentno vezjo veže na beljakovinski substrat. Za ubikvinitizacijo beljakovin je vedno potreben ATP, ubikvitin aktivacijski encim (E_1) in ena od prenašalnih ubikvitin beljakovin (E_2). V teh pogojih pride do kovalentne vezi med eno ubikvitin enoto in substratom. Nekatere konjugacijske reakcije pa potrebujejo še tretji encim, poznan kot ubikvitin beljakovinska ligaza (E_3) za prepoznavanje substrata (Atteix in sod., 1994). Pot razkroja beljakovin, ki zavisi od ATP-ubikvitina, selektivno katalizira cepitev kratkoverižnih in neobičajnih beljakovin v različnih tkivih sesalcev. V skeletnih mišicah se po tej poti cepijo miofibrilarne beljakovine.

MERJENJE SINTEZE IN RAZKROJA BELJAKOVIN

Presnova beljakovin je dinamično ravnotežje med sintezo in razkrojem beljakovin ter je povezana s procesom obnove telesnih beljakovin. Med mirovanjem ostaja masa beljakovin nespremenjena, oba procesa sta enaka. Če pa se masa beljakovin spreminja, je potrebno ločeno meriti sintezo in cepitev beljakovin, saj le tako lahko izmerimo obrat beljakovin. Večina metod za merjenje sinteze in cepitve beljakovin temelji na tehniki izotopov. Enota za merjenje sintetiziranih in razkrojenih beljakovin se imenuje stopnja sinteze oz. stopnja razkroja beljakovin, ki jo izrazimo v množini na enoto časa. Frakcionalna stopnja sinteze beljakovin pa je delež ali odstotek mase beljakovin v predelu oz. tkivu, ki nastane v enoti časa.



Slika 2. Pretok prostih in v beljakovine vezanih aminokislin (Schaefer in Scott, 1993).

Figure 2. Turnover of free and bound amino acids (Schaefer and Scott, 1993).

Slika 2 predstavlja poenostavljen dvo bazenski (two pool) model (Schaefer in Scott, 1993), ki se uporablja za opis presnove beljakovin. Označena (labelled) aminokislina vstopa v bazen prostih aminokislin intravenozno ali z zaužito hrano (I) in se potem vgradi v beljakovino (S) ali pa oksidira (C) v CO₂ in se iz organizma izloči, kot sečnina ali amoniak. Celoten delež prehoda skozi bazen se imenuje iztok (flux - F). Izток dušika ali prostih aminokislin med mirovanjem opisuje naslednja enačba:

$$F = S + C = I + B$$

Obstaja več metod, s katerimi lahko izmerimo sintezo beljakovin, vsaka od teh ima nekaj prednosti in nekaj pomanjkljivosti, zato jih je potrebno poznati, predno se odločimo za določeno metodo. Najbolj znani in uporabljeni metodi sta dolgotrajna, neprenehna infuzija (continuous tracer infusion) označene aminokislina in analiza tkiv oz. organov ter metoda velikih množin (large dose method). Prva metoda temelji na več ur trajajoči neprenehni intravaskularni infuziji označene aminokislina. Na koncu poskusne živali žrtvujemo in odvzamemo potrebna tkiva za analizo (Lobley, 1993). Pri drugi metodi pa veliko množino (5 – 50-kratno) označene aminokislina, največkrat so to radioaktivni izotopi, vbrizgamo v žival. Po celem telesu se hitro vzpostavi ravnovesje, prav tako se izenači aktivnost izotopa. Aktivnost označene aminokislina merimo v kratkem časovnem obdobju, nekaj minut do največ 3 ure po vbrizganju označene aminokislina. Za določitev stopnje sinteze beljakovin v posameznem tkivu živali žrtvujemo, posamezna tkiva pa odvzamemo (McNurlan in sod., 1979).

Ocenjevanje stopnje razkroja beljakovin *in vivo* je še vedno težavno. V nasprotju z merjenjem sinteze beljakovin je tukaj na voljo malo zanesljivih metod. Dostikrat uporabljamo oceno razkroja beljakovin, ki temelji na razliki med sintezo beljakovin in prirastom beljakovin. Vendar se pri tej oceni srečamo z različnimi pomanjkljivostmi. Tako prirast beljakovin merimo v daljšem časovnem obdobju, več dni ali celo tednov, medtem ko sintezo beljakovin izmerimo v nekaj minutah. Prav zaradi tega je potrebna določena poenostavitev. Priljubljena metoda za ocenjevanje cepitve beljakovin v mišicah je merjenje z urinom izločenega 3-metilhistidina. Njegovo koncentracijo uporabljamo kot indeks za izračun cepitve miofibrilarnih mišičnih beljakovin. Druge metode uporabljamo za merjenje razkroja beljakovin *in vitro*, pri katerih izmerimo iztok označene aminokislina, ki je organizem ne presnavlja več in nima možnosti nadaljnje presnove, iz tkiva, npr. fenilalanin ali tirozin iz mišic.

DEJAVNIKI, KI VPLIVAJO NA PRESNOVO IN KROŽENJE BELJAKOVIN

Vemo, da hranilne snovi, ki jih zaužijemo igrajo pomembno vlogo pri kroženju beljakovin. Na samo presnovo in kroženje beljakovin pa vplivajo tudi drugi dejavniki. Eden pomembnejših dejavnikov je hormonsko uravnavanje presnove beljakovin, hkrati pa je kroženje beljakovin odvisno od stanja organizma.

Hormonsko uravnavanje

Mnoge biokemične reakcije uravnavajo hormoni. Pod vplivom hormonov poteka tudi kroženje in presnova beljakovin, vendar so s poskusi *in vivo* doslej razkrili le delovanje nekaterih hormonov. Najbolj znana hormona, ki vplivata na presnovo beljakovin sta inzulin in inzulinu podobni rastni faktor 1 (IGF-1)⁵, ki spodbuja nalaganje aminokislin v mišicah odraslih oseb prek antiproteolitičnega učinka. Za inzulin je značilno, da spodbuja translacijsko fazo sinteze

⁵ Insulin like growth factor

beljakovin v mišicah in zavira proteolizo. S preprečevanjem izločanja inzulina pri mladih živalih je viden njegov vpliv na kroženje beljakovin (Grizard in sod., 1995).

Rastni hormon (GH) ⁶ spodbuja anabolične procese, kot so celična delitev, rast skeleta in sinteza beljakovin, direktno ali indirektno.

Glukokortikoidi vplivajo na zmanjšanje sinteze beljakovin. Kadar pa je nivo zaužitih beljakovin nižji od potreb živali, le-ti vplivajo na zmanjšanje razkroja beljakovin. Oba procesa povzročata zmanjšanje (hiranje) mišične mase.

Hormoni ščitnice spodbujajo predvsem cepitev beljakovin, medtem ko imajo na sintezo beljakovin manjši vpliv (Grizard in sod., 1995). Hayase in sod. (1987) so opazili, da je bila ob dodatku hormonov ščitnice stopnja razkroja beljakovin v jetrih povečana, medtem ko na razkroj beljakovin v tankem črevesu niso imeli posebnega vpliva. Jepson in sod. (1988) so opazili povečano koncentracijo RNK v mišici pod vplivom trijodtironina.

Vpliv substrata

Količina in vrsta zaužite hrane vpliva na nalaganje beljakovin v posamezna tkiva in organe v organizmu. Beljakovine in esencialne aminokislinske hrane spodbujajo oboje, sintezo in razkroj beljakovin (Arnal in sod., 1987). Množina beljakovin v hrani spreminja presnovo beljakovin, ravno tako pa je pomembna aminokislinska sestava beljakovin. Zato zmanjšanje deleža zaužitih beljakovin ali pomanjkanje določene aminokislinske v obroku lahko zmanjša množino sintetiziranih beljakovin (Tesseraud, 1995).

Substrat, še posebej aminokislinske, ima, kot navajajo različni avtorji, zelo verjetno pomembno vlogo pri regulaciji presnove beljakovin v mišicah. Vendar je z uporabo metode preplavljanja (flooding dose method) *in vivo*, pri infuziji aminokislinske opaziti, presenetljivo, le majhno povečanje sinteze beljakovin. S poskusi *in vivo* so dokazali, da aminokislinske lahko delujejo anabolično prek interakcije s hormonom inzulin. Na primer, za celotno antiproteolitično dejavnost hormona inzulina je potrebna zadostna prisotnost aminokislinske (Grizard in sod., 1995).

V zadnjem času veliko proučujejo povezavo med presnovo aminokislinske in energije, vendar pa specifičen vpliv glukoze, maščob in ketonskih teles še ni v celoti razjasnjen (Boirie in Beaufre, 1995).

Kratkoročni vpliv hranilnih snovi

Takoj po obroku se aminokislinske nalagajo v mišicah. Tako se zmanjša primanjkljaj mišičnih beljakovin, do katerega pride v poabsorbivnem obdobju. Velikost tega kroženja je odvisna od vsebnosti beljakovin v obroku (Arnal in sod., 1987). Stopnja razkroja mišične mase zavisi od ravnotežja med sintezo in razkrojem beljakovin. Čim manjša je stopnja razkroja beljakovin, ugotovljena po ATP-ubikvitin proteolitični poti, tem manjši je anabolizem mišičnega tkiva. Do tega verjetno prihaja zaradi vzporednega učinka inzulina, ki spodbuja odlaganje aminokislinske v mišičnem tkivu (Pacy in sod., 1994). Verjetno pa vpliva tudi zmanjšano delovanje glukokortikoidov, ki spodbujajo cepitev beljakovin v mišicah (Millward in sod., 1983).

Dolgoročni vpliv zaužitih beljakovin in aminokislinske

Na dolgoročni vpliv zaužitih beljakovin in aminokislinske deluje na eni strani vsebnost le-teh v obroku, na drugi strani pa kakovost beljakovin oz. uravnoveženost aminokislinske sestave obroka. Dolgotrajno pomanjkanje beljakovin v obroku povzroči zmanjšano sintezo beljakovin, katere vzrok je zmanjšana ribosomalna zmogljivost. Yahya in Millward (1994) in Yahya in sod. (1994) so delali poskuse na mladih podganah. Pokladali so jim krmo z 5 g, 35 g in 70 g

⁶ growth hormone

beljakovin v kilogramu, medtem ko je kontrolna krma vsebovala 200 g beljakovin v kilogramu. Pri vseh poskusnih krmah je bila zmanjšana ribosomalna zmožnost. Pri krmi s 5 g beljakovin v kilogramu se je poleg tega zmanjšala tudi ribosomalna aktivnost, zmanjšal se je tudi razkroj beljakovin. Kaže, da je učinek pomanjkanja beljakovin v obroku povezan z zmanjšanim delovanjem hormonov IGF-I in inzulina.

Dolgo že vemo, da presežek beljakovin (15 - 30 %) pri rastočih podganah samo rahlo izboljša nalaganje beljakovin v mišice. Krivulja stopnje sinteze beljakovin v mišici, izražena kot funkcija beljakovin krme, tudi doseže plato pri visoki vsebnosti beljakovin v krmi (Laurent in sod., 1984). Pri veliki koncentraciji beljakovin v krmi (30 - 40 %), še posebej pri odmerjenem obroku, se je v nekaterih primerih stopnja sinteze beljakovin rahlo zmanjšala. Zaradi visoke vsebnosti beljakovin v krmi se poveča razkroj aminokislin v jetrih in prepreči kopičenje le-teh v krvi.

Z izboljšano kakovostjo beljakovin v obroku vplivamo na povečano rast in nalaganje dušika v organizem ali druge živalske produkte. To dosežemo z dopolnjevanjem obroka z limitirajočimi aminokislinami. Poskus, ki so ga izvedli na tri tedne starih piščancih, ki so jim v obrok dodali lizin (9 g kg^{-1}), je pokazal na povečano nalaganje beljakovin v mišice. Ob tem pa je bilo tudi opaziti povečano absolutno stopnjo sinteze in razkroja beljakovin. Ko je ribosomalna aktivnost optimalna je doseženo največje nalaganje beljakovin (Tesseraud in sod., 1992). Povezava med spremembo kroženja (turnover) beljakovin in koncentracijo hormonov, inzulina, IGF-I in glukokortikoidov ob dodatku aminokislin v obrok pa še ni pojasnjena (Cortamira in sod., 1991).

Vpliv kroničnega pomanjkanja energije

Pomanjkanje energije v obroku dosežemo, če živalim pakladamo obrok z visoko vsebnostjo beljakovin v omejeni količini glede na potrebe po beljakovinah. Stopnja rasti mladih živali se poslabša odvisno od stopnje omejitve energije. Nalaganje maščob se zmanjša, medtem ko se vsebnost beljakovin v tkivih le rahlo zmanjša (Grizard in sod., 1995). Glede na poskusne rezultate ugotavljamo, da je pri omejevanju energije v obroku počasnejša rast kosti, delno tudi na račun relativne rezistence rasti mišic pri omejitvi energije (Yahya in sod., 1994, Yahya in Millward, 1994).

Yahya in sod. (1994) so proučevali vpliv pomanjkanja energije v obroku na dvoglavi mečni mišici (*m. gastrocnemius*) pri rastočih podganah. Živali so dobivale krmo z enako vsebnostjo beljakovin, le da so jim omejili množino krme na 75 %, 50 % in 25 %, kot bi jo zaužile pri *ad libitum* krmljenju. Po štirih dneh je stopnja sinteze beljakovin ostala na relativno visoki ravni pri vseh skupinah, le pri skupini s 25 % krmljenjem se je zmanjšala za 40 %. Po osmih dneh preskusa je stopnja sinteze beljakovin rahlo padla tudi pri skupini s 75 % in 50 % krmljenjem, pri skupini s 25 % krmljenjem pa se je še nadalje zmanjšala. Pri vseh treh skupinah je bila nekoliko zmanjšana ribosomalna zmožnost, ribosomalna učinkovitost pa se je zmanjšala le pri skupinah s 25 % in 50 % krmljenjem tako po štirih kot tudi po osmih dneh preskusa. Razkroj beljakovin je ostal nespremenjen, le pri skupini s 25 % krmljenjem se je po 8 dneh povečal za 40 %.

Vpliv dolgotrajnega stradanja

Pri stradanju odraslih podgan obstajajo 3 faze, ki se odražajo v spremembah v dnevni izločanju dušika in dnevni zmanjšanju telesne mase. V prvi fazi, drugi in tretji dan, se zmanjša izločanje dušika in sprememba mase glede na enoto mase živali za 60 %. Oba parametra se v drugi fazi, tretji do sedmi dan, umirita, v tretji fazi, sedmi do deseti dan, pa se povečata za dvakrat. Po dvodnevni stradanju se je pri mladih podganah frakcionalna stopnja sinteze beljakovin v jetrih zmanjšala od 87 % dan^{-1} , kakršna je bila pri kontrolni skupini, na 62 % dan^{-1} pri poskusni skupini (McNurlan in sod., 1979).

V drugi fazi pride do varčevanja z beljakovinami, kar pomeni, da se živali prilagodijo nastalim razmeram z zmanjšanjem razkroja beljakovin v telesu. Stopnja sinteze beljakovin v skeletnih mišicah ostane na isti ravni, ker se ribosomalna učinkovitost povrne na isto raven po kratkotrajnem zmanjšanju v prvi fazi. Po 9 dneh stradanja podgane začnejo beljakovinsko hirati. V tem času se razkroj beljakovin nič več ne povečuje in znaša okoli 80 % vrednosti pri sitih podganah. Nasprotno pa se je sinteza beljakovin v mišicah izrazito zmanjšala, kot rezultat zmanjšane ribosomalne zmožnosti in učinkovitosti (Chérel in sod., 1991).

Podgane in druge vrste živali lahko ohranjajo beljakovine v skeletnih mišicah med zmernim stradanjem, kar zavisi od enakomerne oskrbe z maščobami. Glede na to raziskovalci predpostavljajo, da maščobni priliv neposredno uravnava presnovo beljakovin v mišicah in preprečuje bistveno povečanje koncentracije katabolnih hormonov, glukokortikoidov, v kroženju (Lowell in Goodman, 1987). Zmanjšana dejavnost anabolnih hormonov, IGF-I, inzulina, ravnega hormona in hormonov ščitnice, verjetno prispeva k učinku stradanja podgan (Thissen in sod., 1994).

Spremembe med staranjem

Izguba mišične mase v obdobju staranja so pri ljudeh in živalih dobro opisane (Holloszy in sod., 1991), kar se ujema z manjšanjem mase mišičnih beljakovin, ki je rezultat neuravnoteženosti med sintezo in cepitvijo beljakovin v mišici.

Med sistematičnim opazovanjem vpliva staranja na sintezo in razkroj beljakovin pri opazovanih vrstah živali so opazili zmanjšano stopnjo sinteze in tudi razkroja beljakovin. Ta proces poteka v vseh tkivih in organih v telesu od rojstva do starosti (postnatal) (Lobley, 1993). Izrazitejša zmanjšanje sinteze in razkroja beljakovin nastopi v mišični masi. Pri starih živalih so te vrednosti le okoli 30 % vrednosti ob rojstvu. V ostalih tkivih, jetrih, ledvicah, tankem in debelem črevesu se frakcionalna stopnja sinteze beljakovin prav tako zmanjša, vendar v manjšem obsegu (Goldspink in Kelly, 1984, Mosoni in sod., 1993). Te spremembe so posledica padca ribosomalne zmožnosti.

Pri starejših osebkih prevladuje visoka vsebnost glukokortikoidov, kar lahko povzroči rahlo, vendar dolgotrajno neravnotežje med sintezo in razkrojem beljakovin v mišici (Grizard in sod., 1995), še posebej, ker so ti osebki bolj dovzetni za delovanje teh hormonov.

V jetrih komaj rojenih podgan je 12 % vseh telesnih beljakovin. Ta delež pa se s staranjem zmanjšuje in pri starih živalih znaša okoli 4 %. Ko mlade podgane odstavimo od mater, se masa beljakovin v prebavilih poveča. Zato se poveča presnova beljakovin vsega telesa od 10 do 33 %, vendar pa se absolutna in frakcionalna stopnja sinteze beljakovin zmanjšata (Merry in sod., 1992). To je v veliki meri posledica s starostjo povezanega zmanjšanja ribosomalne učinkovitosti.

Vpliv genetske sestave na presnovo beljakovin

S selekcijskim odbiranjem mnogih generacij dobimo pri prenekaterih živalskih vrstah genetske linije z različno stopnjo rasti. Med njimi obstajajo razlike v mišični masi, v številu in premeru mišičnih vlaken. To pomeni, da je stopnja sinteze beljakovin v mnogih organih in tkivih, še posebej v mišicah, odvisna od genetske linije vrste. Bates in Millward (1981) sta merila sintezo beljakovin in stopnjo rasti mišic pri hitro in počasi rastočih linijah podgan. Iz dobljenih rezultatov sta sklepala, da je za najvišjo učinkovitost pri sintezi beljakovin v veliki meri odgovorna nizka stopnja razkroja beljakovin pri hitro rastočih podganah v primerjavi s počasi rastočo linijo. Saunderson in Leslie (1988) sta dobila podobne rezultate pri primerjanju brojlerskih linij kokoši, hitro rastočo linijo sta primerjala s počasi rastočimi linijami kokoši nesnic.

PRESNOVA BELJAKOVIN V TKIVIH

Sinteza beljakovin v telesu je vsota njihove sinteze v posameznih organih in tkivih. V posameznem tkivu oz. organu določimo frakcionalno stopnjo sinteze beljakovin. Neto masa beljakovin tkiva ni vedno odraz presnovne aktivnosti beljakovin. Glede na frakcionalno stopnjo sinteze beljakovin si organi sledijo v približno enakem vrstnem redu pri večini živali. Pri tem dosegajo najvišjo stopnjo sinteze beljakovin organi in tkiva gastrointestinalnega trakta in jetra, sledijo jim ledvice, koža in mišice. Razmerje v presnovni aktivnosti beljakovin med posameznimi tkivi ni stalno in se menja s staranjem in verjetno tudi z zauživanjem hrane.

Tkiva gastrointestinalnega trakta

Tkiva gastrointestinalnega trakta so najbolj dejavna tkiva v telesu. McNurlan in sod. (1980) ugotavljajo, da je stopnja sinteze beljakovin v tankem črevesu pri mladih podganah $103,4 \text{ \% dan}^{-1}$, v debelem črevesu pa $62,1 \text{ \% dan}^{-1}$. Pri 6 – 9 dni starih jagnjetih, še neprežvekovalcih, je frakcionalna stopnja sinteze beljakovin v celem gastrointestinalnem traktu 69 \% dan^{-1} , kar je trikrat več kot stopnja sinteze beljakovin v skeletnih mišicah (22 \% dan^{-1}) pri istih živalih (Attaix in Arnal, 1987, Attaix in sod., 1988b). V tkivih prebavnega trakta je le okoli 4 % vseh telesnih beljakovin, medtem ko jih je v mišicah 31 %. Tako prispevajo tkiva prebavnega trakta 12 % k sintezi beljakovin vsega telesa, mišice pa 29 %. Pri starejših živalih, predvsem prežvekovalcih, se ta porazdelitev spremeni. Masa beljakovin v tkivih prebavnega trakta se glede na celotno maso beljakovin poveča na 6 – 8 %, frakcionalna stopnja sinteze beljakovin lahko pade tudi za 50 %. V mišicah se le-ta lahko zmanjša za desetkrat in več (Lobley in sod., 1980). Ta pojav je prisoten predvsem pri prežvekovalcih zaradi velikega obsega prebavnega trakta glede na maso živali. V teh pogojih naraste prispevek tkiv in organov v prebavnem traktu k celotni sintezi beljakovin z 12 % na 27 % (Attaix in sod., 1988a).

Jetra

Pri mladih podganah je stopnja sinteze beljakovin v jetrih povprečno $105,4 \text{ \% dan}^{-1}$ (McNurlan in sod., 1980). Presnova beljakovin se tudi v jetrih spreminja s starostjo živali in z dotokom hranil. Pri en teden starih jagnjetih so izmerili stopnjo sinteze beljakovin 100 \% dan^{-1} , pri 8 tednov starih pa je padla na 50 \% dan^{-1} . Stopnja sinteze beljakovin je s starostjo živali še naprej padala in je pri 5 – 9 mesecev starih jagnjetih znašala 25 – 35 % dan^{-1} (Lobley in sod., 1992). Eden od vzrokov za take spremembe je v tem, da jetra prispevajo k skupni sintezi beljakovin ob rojstvu živali 12 %, nato pa ta delež pada in znaša pri odraslih živalih samo 7 %, kar jasno kaže na pomembnost presnove beljakovin v jetrih v prvih dneh življenja, še posebej, ker vsebujejo le 3 % vseh telesnih beljakovin.

Skeletne mišice

Mišice predstavljajo največjo zalogo beljakovin v telesu. Delež telesnih beljakovin v mišicah naraste od približno 30 % ob rojstvu na 45 % pri odraslih osebkih. Prav tako se največ povečuje masa beljakovin v mišicah. Ker sta glavni nalogi mišic gibanje in rezerva beljakovin, je presnovna dejavnost beljakovin manjša, kot pri notranjih organih. V mišicah s starostjo stopnja sinteze beljakovin najbolj vpade. Tako je pri teden dni starih jagnjetih frakcionalna stopnja sinteze beljakovin približno 22 \% dan^{-1} , ob odstavitvi le 6 \% dan^{-1} (Attaix in sod., 1988a), nato še naprej pada do 3 \% dan^{-1} ali manj, ko živali dosežejo maso 30 – 40 kg (Lobley in sod., 1990).

POVZETEK

Neto prirast in prav tako izgube beljakovin vodita dva nasprotujoča procesa, sinteza in cepitev beljakovin. Sinteza beljakovin poteka prek številnih zapletenih reakcij, ki se dogajajo v jedru in citosolu celice, ter na drugih subcelularnih mestih in je dokaj dobro raziskana. Nasprotno pa mehanizem razkroja beljakovin slabo poznamo. V tkivih so navzoči trije glavni proteolitični sistemi: lizosomalni, od Ca^{2+} odvisni in od ATP-ubikvitina odvisni proteolitični sistem.

Obstaja veliko metod za merjenje kroženja beljakovin. Izbira med njimi zavisi od problema, ki ga želimo raziskovati in od poskusnih pogojev. Vse metode vključujejo domneve, predpostavke in približne ocene, kar vse pripomore k določeni napaki.

Hormoni sodelujejo pri urejanju in vodenju mnogih biokemičnih procesov, ki sodelujejo pri kroženju beljakovin. Infuzija hormona inzulin ali IGF-1 spodbudi nalaganje aminokislin s antiproteolitičnim vplivom. Hormoni, ki se tudi vključujejo v presnovo in kroženje beljakovin, so še rastni hormon, glukokortikoidi in hormona žleze ščitnice. Substrat, še posebej aminokislina, imajo potencialno vlogo pri uravnavanju presnove beljakovin. Med absorpcijo hranilnih snovi se aminokislina nalagajo, to pa vpliva na izgubo beljakovin v poabsorptivnem stadiju. Pomanjkanje beljakovin v obroku povzroči naglo zmanjšanje sinteze beljakovin. Proces cepitve beljakovin kaže nasprotno reakcijo, odvisno od strogosti omejitve. Med staranjem so izgube beljakovin v mišicah velike, starejše živali so bolj dovzetne za glukokortikoide, ki zmanjšujejo sintezo beljakovin. Hranilne snovi, še posebej aminokislina so močan usklajevalec presnove beljakovin. Slabo poznavanje mehanizma izvira iz zapletenosti povezav med hormoni in substratom.

Doprinos različnih organov k sintezi beljakovin v telesu pa ni odvisen samo od deleža beljakovin v njih glede na celotno vsebnost beljakovin v telesu. Skeletne mišice vsebujejo polovico vseh telesnih beljakovin, vendar imajo nizko frakcionalno stopnjo sinteze beljakovin in tako sintetizirajo le 20 - 30 % vseh telesnih beljakovin. Ostali organi, predvsem tkiva prebavnega trakta, vsebujejo le 5 % telesnih beljakovin, vendar sintetizirajo isto množino telesnih beljakovin kot skeletne mišice zaradi visoke frakcionalne stopnje sinteze beljakovin v teh tkivih.

SUMMARY

Net gain or loss of proteins is ultimately determined by a balance between two opposite processes, protein synthesis and degradation. Synthesis of a new protein is achieved *via* a complex series of reactions that occurs in the nucleus, cytosol and various subcellular locations. In contrast, mechanisms of proteolysis are only poorly understood, especially with respect to the role of three major proteolytic systems present in the tissues, i. e., the lysosomal, Ca^{2+} dependent and ATP-ubiquitin dependent proteolytic pathway.

There are many methods for measuring protein turnover. The choice between them depends upon the problem which has to be studied and upon the particular experimental conditions used. All of techniques include assumptions and approximations which are sources of error.

Hormones have been shown to regulate many biochemical events involved in protein turnover. Insulin and IGF-1 infusions stimulate amino acid deposition through antiproteolytic effect. The other hormones, which are involved in the protein metabolism, are growth hormone, glucocorticoids, thyroid hormones. Substrates, especially amino acids have a potential role in the regulation of protein metabolism. Periods of absorption of nutrients result in amino acid deposition, repleting the loss of protein which occurs during postabsorptive states. Protein deficiency induces a graded inhibition of protein synthesis. Protein degradation shows contrasting results depending on the severity of the restriction. There is a marked loss of muscle proteins during ageing. Old animals are more sensitive to glucocorticoids. Nutrients, especially amino acids, are powerful modulators of protein metabolism. The poor understanding of

mechanisms arises from the complexity of interactions among various hormones and between hormones and substrates.

The contribution of various organs to whole body protein synthesis does not reflect their contribution to the protein content of the body. While skeletal muscle, containing half of body proteins but having a low fractional synthesis rate, synthesises only 20 to 30 per cent of the whole body proteins, other organs such as the digestive tract, containing only 5 % of body proteins, synthesise per day approximately the same amount of proteins owing to the very high fractional protein synthesis rates.

ZAHVALA

Gospodu dr. Philippu Patureau Mirand-u se najlepše zahvaljujem za spodbudo pri delu ter vodenje pri odkrivanju meni takrat bolj malo znanih potankosti v svetu presnove in kroženja beljakovin.

VIRI

- Arnal, M. / Obled, C. / Attaix, D. / Patureau Mirand, P. / Bonin, D. Dietary control of protein turnover. *Diabete et Metabolisme*, 13(1987), 630-642.
- Attaix, D. / Arnal, M. Protein synthesis and growth in the gastrointestinal tract of the young pre-ruminant lamb. *British Journal of Nutrition*, 58(1987)1, 159-169.
- Attaix, D. / Arousseau, E. / Boyle, G. / Rosolowska-Huszcz, D. / Arnal, M. Respective influences of age and weaning on skeletal and visceral muscle protein synthesis in the lamb. *Biochemical Journal*, 256(1988a)7, 791-795.
- Attaix, D. / Arousseau, E. / Manghebati, A. / Arnal, M. Contribution of liver, skin and skeletal muscle to whole-body protein synthesis in the young lamb. *British Journal of Nutrition*, 60(1988b)1, 77-84.
- Attaix, D. / Taillandier, D. / Temparis, S. / Larbaud, D. / Arousseau, E. / Combaret, L. / Voisin, L. Regulation of ATP-ubiquitin dependent proteolysis in muscle wasting. *Reproduction Nutrition Development*, 34(1994)6, 583-597.
- Bates, P. C. / Millward, D. J. Characteristics of skeletal muscle growth and protein turnover in a fast - growing rat strain. *British Journal of Nutrition*, 46(1981)1, 7-13.
- Benevenga, N. J. / Gahl, M. J. / Blemings, K. P. Role of protein synthesis in aminoacid catabolism. *Journal of Nutrition*, 123(1993)2 II., 332-336.
- Boirie, Y. / Beaufriere, B. Control of amino acid metabolism by lipid, ketone bodies, and glucose substrates. V: *Amino Acid Metabolism and Therapy in Health and Nutritional Disease* (ur.: Cynober L.A.). New York, CRC Press, 1995, 157-179.
- Cherel, Y. / Attaix, D. / Rosolowska - Huszcz, D. / Belkhou, R. / Robin, J - P. / Arnal, M / Le Maho, Y. Whole body protein synthesis during brief and prolonged fasting in the rat. *Clinical science*, 81(1991)5, 611-619.
- Cortamira, N. O. / Seve, B. / Lebreton, Y. / Ganier, P. Effect of dietary tryptophan on muscle, liver and whole-body protein synthesis in weaned piglets: relationship to plasma insulin. *British Journal of Nutrition*, 66(1991)3, 423-435.
- Goldspink, D. F. / Kelly, F. J. Protein turnover and growth in the whole body, liver and kidney of the rat from foetus to senility. *Biochemical Journal*, 217(1984), 507-516.
- Grizard, J. / Dardevet, D. / Papet, I. / Mosoni, L. / Patureau Mirand, P. / Attaix, D. / Tauveron, I. / Bonin, D. / Arnal, M. Nutrient regulation of skeletal muscle protein metabolism in animals. The involvement of hormones substrates. *Nutrition Research Reviews*, 81(1995), 67-91.
- Hayase, K. / Yonekawa, G. / Yoshida, A. Effect of thyroid hormone on turnover of tissue protein in rats. *Nutritional Reports International*, 35(1987)2, 393-404.
- Holloszy, J. O. / Chen, M. / Cartee, G. D. / Young, J. C. Skeletal muscle atrophy in old rats: differential changes in the three fiber types. *Mechanism of ageing and development*, 60(1991)1, 199-213
- Jepson, M. M. / Bates, P. C. / Millward, D. J. The role of insulin and thyroid hormones in the regulation of muscle growth and protein turnover in response to dietary protein in the rat. *British Journal of Nutrition*, 59(1988)3, 397-415.
- Laurent, B. C. / Moldawer, L. L. / Young, V. R. / Bistrrian, B. R. / Blackburn, G. L. Whole-body leucine and muscle protein kinetics in rats fed varying protein intakes. *American Journal of Physiology*, 246(1984), E444-E451.
- Lehninger, A.L. *Principles of Biochemistry*. New York Worth Publishers, Inc., 1988, 1011.

- Lobley, G. E. Species comparisons of tissue protein metabolism effects of age and hormonal action. *Journal of Nutrition*, 123(1993)2-II, 337-343.
- Lobley, G. E. / Conell, A. / Milne, E. / Buchan, V. / Calder, A. G. / Anderson, S. E. Muscle protein synthesis in response to testosterone administration in wether lambs. *British Journal of Nutrition*, 64(1990)4, 691-704.
- Lobley, G. E. / Harris, P. M. / Skene, P. A. / Brown, D. / Milne, E. / Calder, A. G. Responses in tissues protein synthesis to sub- and supra-maintenance intake in young growing sheep; comparison of large dose and continuous infusion techniques. *British Journal of Nutrition*, 68(1992)3, 373-388.
- Lobley, G. E. / Milne, V. / Lovie, J. M. / Reeds, P. J. / Pennie, K. Whole body and tissue protein synthesis in cattle. *British Journal of Nutrition*, 32(1980)4, 491-502.
- Lowell, B. B. / Goodman, M. N. Protein sparing in skeletal muscle during prolonged starvation. Dependence on lipid fuel availability. *Diabetes*, 36(1987)1, 14-19.
- McNurlan, M. A. / Garlic, P. J. Contribution of rat liver and gastrointestinal tract to whole-body protein synthesis in the rat. *Biochemical Journal*, 186(1980), 381-383.
- McNurlan, M. A. / Tomkins, A. M. / Garlic, P. J. The effect of starvation on the rate of protein synthesis in rat liver and small intestine. *Biochemical Journal* 178(1979), 373-379.
- Merry, B. J. / Lewis, S. E. M. / Goldspink, D. F. The influence of age and chronic restricted feeding on protein synthesis in the small intestine of the rat. *Experimental Gerontology*, 27(1992), 191-200.
- Millward, D. J. / Odedra, B. / Bates, P. C. Role of insulin, corticosterone and other factors in the acute recovery of muscle protein synthesis on refeeding food-deprived rats. *Biochemical Journal*, 216(1983)5, 583-587.
- Mosoni, L. / Patureau Mirand, P. / Houlier, M. L. / Arnal, M. Age-related changes in protein synthesis measured *in vivo* in rat liver and gastrocnemius muscle. *Mechanism of aging and development*, 68(1993)113, 209-220.
- Munro, H. N. A general survey of mechanism regulating protein metabolism in mammals. V: Mammalian protein metabolism (ur.: H. N. Munro). Vol. 4. New York and London, Academic press, 1970, 53-130.
- Pacy, P. J. / Price, G. M. / Holliday, D. / Quevedo, M. R. / Millward, D. J. Nitrogen homeostasis in man: the diurnal response of protein synthesis and degradation and amino acid oxidation to diets with increasing protein intakes. *Clinical Science*, 86(1994)1, 103-118.
- Saunderson, C. L. / Leslie, S. Muscle growth and protein degradation during early development in chicks of fast and slow-growing strains. Comparison in *Biochemistry and Physiology*, 89(1988), 333-337.
- Schaefer, A. L. / Scott, S. L. Amino acid flooding doses for measuring rates of protein synthesis. *Amino Acids*, 4(1993)8, 5-19.
- Tesseraud, S. Métabolisme protéique chez le poulet en croissance. Effect des protéines alimentaires. *INRA Production Animale*, 8(1995)3, 197-212.
- Tesseraud, S. / Larbier, M. Chagneau, A. M. / Geraert, P. A. Effect of dietary lysine on muscle protein turnover in growing chickens. *Reproduction, Nutrition, Développement*, 32(1992)1, 163-171.
- Thissen, J. P. / Ketelslegers, J. M. / Underwood, L. E. Nutritional regulation of the insulin-like growth factors. *Endocrine Reviews*, 15(1994)1, 80-101.
- Twining, S. S. Regulation of proteolytic activity in tissues: Critical reviews in biochemistry and molecular biology, 29(1994)5, 315-383.
- Waterlow, J. C. / Garlick, P.J. / Millward, D. J. Protein turnover in mamalian tissues and in the whole body. Amsterdam, North-Holland publishing company, 1978, 804.
- Yahya, Z. A. H. / Millward, D. J. Dietary protein and the regulation of long bone and muscle growth in the rat. *Clinical science* 87(1994)2, 213-224.
- Yahya, Z. A. H. / Tirapegui, J. O. / Bates, P. C. / Millward, D. J. Influence of dietary protein, energy and corticosteroides on protein turnover, proteoglycan sulphation and growth of long bone and skeletal muscle in the rat. *Clinical nutrition*, 87(1994)6, 607-618.