

25. Sasa M., Avner B. P., Albuquerque E. X. Eur. J. Pharmacol., 23, 97, 1973.
27. Seeman P. Pharmacol. Rev., 24, 583, 1972.
28. Strichartz G. Anesthesiology, 45, 421, 1976.
29. Surewicz W. K., Leyko W. Biochem Biophys. Acta., 643, 387, 1981.

1.

«Биолог. ж. Армении», т XXXVIII, № 1, 1982

УДК 577.156

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМА ИНГИБИРОВАНИЯ ГЛИКОЗАМИНОГЛИКАНАМИ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ТРИПСИНА

К. Л. ЕРЗИНҚЯН

Методами микрокалориметрии и УФ-дифференциальной спектроскопии изучено влияние гликозаминогликанов (гепарина, хондроитинсульфата, гиалуроновой кислоты) протеолитическую активность трипсина при pH среды 8,0. Установлено их ингибирующее действие на протеолитическую активность трипсина, являющееся следствием усиления в щелочной среде необратимой инактивации трипсина в присутствии гликозаминогликанов. Показано, что этот процесс связан со способностью гликозаминогликанов вызывать денатурационные изменения в молекуле фермента.

Ключевые слова: трипсин, гепарин, хондроитинсульфат, гиалуроновая кислота.

Согласно современным представлениям, процесс язвообразования в желудке и двенадцатиперстной кишке обусловлен нарушенном равновесии между агрессивными свойствами желудочного сока, дуоденального содержимого и резистентностью гастродуоденальной стенки.

К агрессивным факторам воздействия на слизистую гастродуоденальной стенки относятся соляная кислота, секретлируемая обкладочными клетками желудка, протеолитические ферменты желудочного сока и дуоденального содержимого [1]. Патогенное действие протеолитических ферментов дуоденального содержимого связано с «дуоденальным рефлексом», представляющим собой обратный заброс дуоденального содержимого в антральную область желудка, что приводит к подщелачиванию среды и активации протеолиза слизистой [1, 7]. В то же время в обеспечении резистентности гастродуоденальной стенки участвуют входящие в состав ее слизи гликозаминогликаны (хондроитинсульфат, гиалуроновая кислота и другие гепариноподобные вещества) [10].

Нами с целью выяснения природы защитного физиологического действия гликозаминогликанов гастродуоденальной стенки изучено их влияние с трипсином.

Материал и методика. Использовались препараты трипсина и гепарина («Спофла», Чехословакия), хондроитинсульфата («Сервис», ФРГ), гиалуроновой кислоты, димекната натрия («Реалхим», СССР).

Ацетилированный трипсин получали по методу Френкель-Конрата с соэпт. [8]: препарат обрабатывали в полунасыщенном растворе ацетата натрия уксусным ангидридом (1,2 мл ангидрида на 1 г белка), подвергали диализу в течение 24 ч при 5° против дистиллированной воды, лиофилизировали, процедуру ацетилирования повторяли. Степень ацетилирования препарата составляла 76,4%.

Растворы гликозаминогликанов и казеината натрия готовили в 0,05 М трис-НСI буфере, рН 8,0, а раствор трипсина—для предотвращения автолиза—в 0,0025 М НСI. Концентрацию трипсина в растворе рассчитывали по величине оптической плотности на 280 нм с использованнем коэффициента пересчета 0,585.

Микрокалориметрические измерения выполняли на приборе 2107-020 фирмы ЛКБ с использованнем проточной ячейки. Скорость прокачки реакционной смеси в ячейку микрокалориметра составляла $4,17 \cdot 10^{-6}$ л/сек. Рабочая температура была равна 25°.

Инкубационный раствор готовили смешением 0,5%-ного раствора трипсина с раствором гликозаминогликана в объемном соотношении 1:19. Реакционную смесь получали путем добавления инкубированной в течение определенного времени смеси трипсин-гликозаминогликан к 2% раствору казеината натрия. Объемное отношение реагентов в растворе составляло 1:50. Тепловой эффект реакции регистрировали относительно базовой линии, полученной при прокачке раствора казеината натрия.

Спектрофотометрические измерения проводили на приборе «Спекторд М 40» в термостатированных при 25° 1-сантиметровых кварцевых кюветках.

Результаты и обсуждение. Возможность применения метода проточной микрокалориметрии для изучения ферментативных реакций подробно обсуждена в работе Бизера и Тиррела [6]. Как показано авторами, для реализуемого в наших экспериментах случая насыщения фермента субстратом наблюдается прямо пропорциональная зависимость тепловой мощности реакции от активности фермента.

Изменение исходной активности фермента в зависимости от времени инкубации с гликозаминогликанами графически может быть представлено в виде прямых в координатах $(C_0/C_t) - t$, где C_0 —величина, определяемая путем экстраполяции прямой автолиза к моменту времени $t=0$.

На рис. 1 представлены кинетические прямые инактивации трипсина в присутствии различных концентраций гиалуроновой кислоты, хондроитинсульфата и гепарина. Из наклона прямых были определены константы скорости автолиза фермента, что позволило построить зависимости скорости инактивации трипсина от содержания гликозаминогликанов в инкубационной смеси (рис. 2).

Как видно из рис. 2, для гиалуроновой кислоты, хондроитинсульфата и гепарина зависимости имеют экстремальный характер, причем в точке экстремума скорость автолиза трипсина в присутствии гликозаминогликанов значительно превышает скорость инактивации трипсина в растворе, не содержащем их.

С целью выявления природы взаимодействия трипсина с гликозаминогликанами было проведено сравнительное изучение их влияния на протеолитическую активность трипсина и ацетилтрипсина, получены дифференциальные спектры поглощения смесей трипсина-гликозаминогликан относительно составляющих их компонентов.

Ацетилирование трипсина делает его устойчивым к самоперевариванию в слабощелочной среде, рН 8,0, что согласуется с литературными

данными [3]. Добавление в раствор гликозаминогликана также не приводит к инактивации ацетилтрипсина.

Дифференциальные спектры поглощения смесей трипсина-гепарина, трипсина-хондроитинсульфат и трипсина-гиалуроновая кислота (время

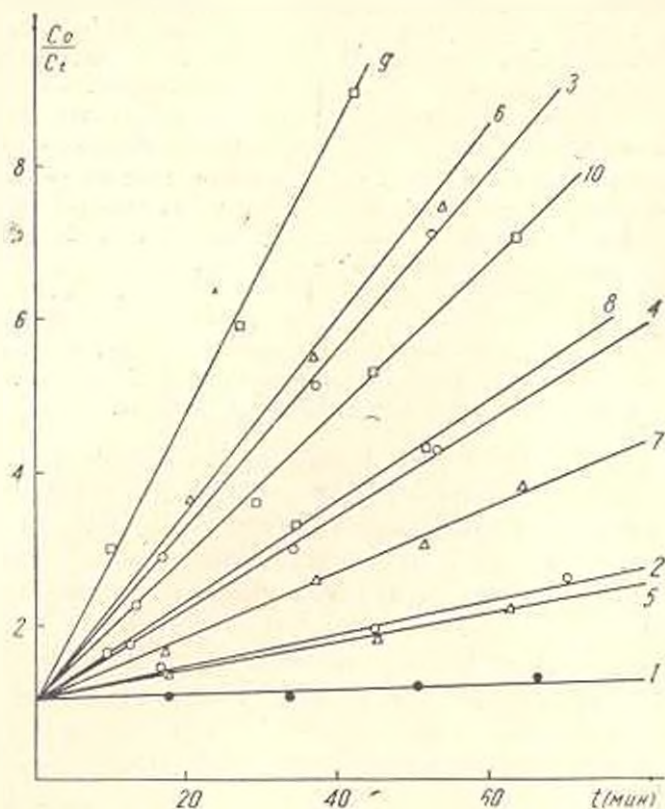


Рис. 1. Кинетика инактивации лативного трипсина (1) и трипсина в присутствии различных концентраций (мг/мл) гиалуроновой кислоты— $9,5 \cdot 10^{-4}$ (2); $9,5 \cdot 10^{-3}$ (3); $2,85 \cdot 10^{-2}$ (4); хондроитинсульфата — $1,9 \cdot 10^{-3}$ (5); $4,75 \cdot 10^{-2}$ (6); $3,8 \cdot 10^{-1}$ (7); гепарина— $9,5 \cdot 10^{-3}$ (8); $4,75 \cdot 10^{-2}$ (9); $3,16 \cdot 10^{-1}$ (10).

инкубации 10 мин) относительно составляющих их компонентов указывают на изменение в поглощении остатков ароматических аминокислот трипсина при его взаимодействии с гликозаминогликанами (рис. 3). В наибольшей степени эти изменения выражены для комплекса трипсина—гепарина.

Экстремальный характер зависимостей констант скоростей инактивации трипсина от концентрации гликозаминогликанов можно объяснить изменением эффективной концентрации фермента вблизи полимерной цепи [1]. С повышением концентрации гликозаминогликанов в растворе локальная концентрация трипсина в области молекул поликислоты возрастает (усиление автолиза), достигая максимума при насыщении молекул поликислоты. При дальнейшем увеличении концентрации гликозаминогликана происходит нераспределение молекул фер-

мента между молекулами поликислоты и уменьшение локальной концентрации трипсина.

В рассматриваемой области физиологических значений pH 8,0 количество положительно заряженных групп в молекулах фермента преобладает над отрицательно заряженными группами (изоэлектрическая точка трипсина 10,5) и вследствие этого они в целом заряжены положи-

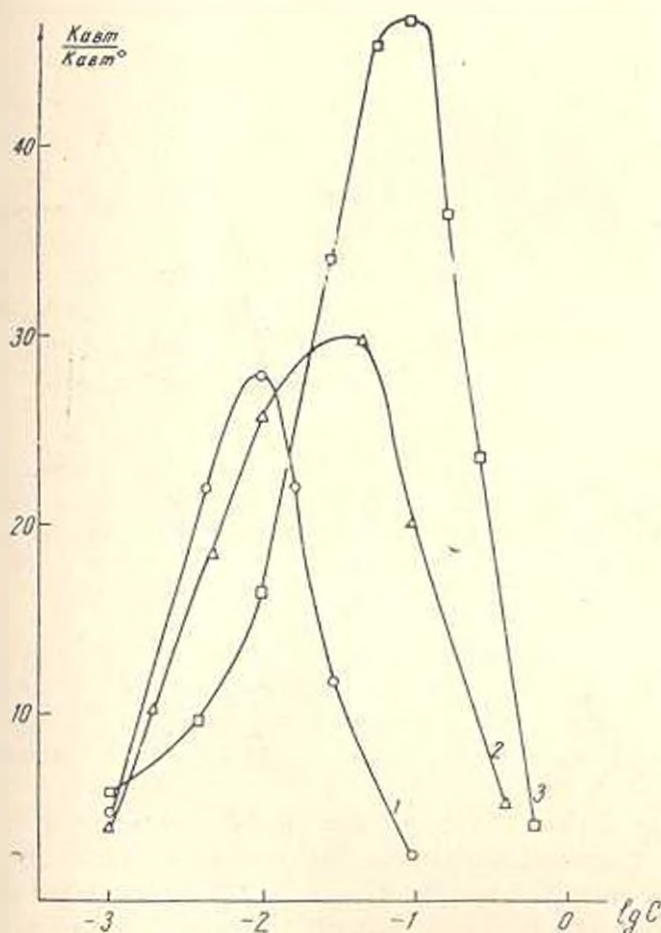


Рис. 2. Зависимость относительной константы автолиза трипсина от логарифма концентрации гликозаминогликанов (мг/мл): гиалуроновая кислота (1), хондроитинсульфат (2), гепарин (3).

тельно. В этих же условиях полимерные цепи гликозаминогликанов полностью ионизированы и несут отрицательный заряд ввиду значительного содержания ионизируемых групп (карбоксильные группы гиалуроновой кислоты, сульфо-, карбоксильные группы гепарина и хондроитинсульфата). Последние вступают в электростатическое взаимодействие с положительно заряженными аминогруппами трипсина.

Участие ε-аминогрупп фермента в электростатическом связывании подтверждается полученными данными об отсутствии инактивирующего действия гликозаминогликанов на ацетилтрипсин, у которого эти группы заблокированы.

Связывание трипсина гликозаминогликанами сопровождается разрушением гидрофобной оболочки фермента. Молекула трипсина содержит большое количество остатков с гидрофобными боковыми цепями, играющими важную роль в поддержании его нативной структуры [11]. При комплексообразовании фермента с гликозаминогликанами часть аминокислотных остатков тирозина и триптофана, локализован-

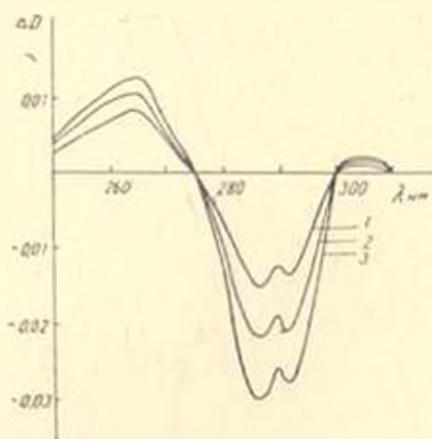


Рис. 3. Дифференциальные спектры поглощения смесей трипсина—гиалуроновая кислота (1), хондроитинсульфат (2), трипсина—гепарина (3) относительно составляющих их компонентов. Концентрации трипсина в растворе 0,25 мг/мл, гиалуроновой кислоты—0,1 мг/мл; хондроитинсульфата—0,075 мг/мл; гепарина—0,015 мг/мл.

ных внутри гидрофобного ядра белка, переходит в область доступного растворителю (из среды с более высоким показателем преломления в среду с более низким показателем преломления), что должно обуславливать наблюдаемый на дифференциальных спектрах «голубой сдвиг» [9].

В пользу вывода о конформационных перестройках в молекуле трипсина под действием гликозаминогликанов свидетельствует дифференциальный спектр денатурированного в 8 М мочеvine трипсина относительно нативного трипсина, который, согласно литературным данным [2], имеет аналогичный «голубой сдвиг».

Процесс автолиза трипсина можно рассматривать как расщепление нативным ферментом своей частично денатурированной формы [1]. Это позволяет предположить, что усиление процесса самопереваривания трипсина под действием гликозаминогликанов связано с их способностью вызывать денатурационные изменения в молекуле фермента.

Предложенный механизм усиления необратимой инактивации трипсина под действием гликозаминогликанов хорошо согласуется с экспериментальными данными. Гепарин вызывает наибольшие денатурационные изменения в молекуле трипсина и обладает способностью максимально увеличивать скорость инактивации фермента.

В заключение следует отметить, что одним из механизмов защитного физиологического действия гликозаминогликанов гастродуоде-

пальной стенки может являться их способность усиливать процесс самопереваривания трипсина.

НИИ по биологическим испытаниям химических соединений,

Купавна, Московская область

Поступило 15.VIII 1984 г.

ՏՐԻՊՏԻՆԻ ՊՐՈՏԵՈԼԻՏԻԿ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՎՐԱ ԳԼԻՍԻՉԱՄԻՆԳԼԻՍԻՏԻՆՆԵՐԻ
ԽՆՀԻՐՈՏՈՐԿԱՆ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅԱՆ ՄԵՆԱՆԻԶՄԻ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆԸ

Կ. Լ. ԵՐԶԻՆԿԱՆ

Միկրոկալորիմետրիկ և ուլտրամանուշակագույն (ՈՒՄ)-դիֆերենցիալ մեթոդով ուսումնասիրվել է գլիկոզամինգլիկանների (հեպարինի, խոնդրոսինսուլֆատի, հիալուրոնաթթվի) ազդեցությունը տրիպսինի պրոտեոլիտիկ ակտիվության վրա pH 8,0 միջավայրում: Որոշված է նրանց ինհիբիտորային ազդեցությունը տրիպսինի պրոտեոլիտիկ ակտիվության վրա, որը գլիկոզամինգլիկանների ներկայությամբ տրիպսինի անդառնալի ինակտիվության ուժեղացման հետևանք է ակալային միջավայրում: Ցույց է տրված, որ այդ պրոցեսը կախված է գլիկոզամինգլիկանների կարողությունից՝ կատարելու անդառնալի փոփոխություններ տրիպսինի մոլեկուլում:

INVESTIGATION OF THE MECHANISM OF GLYCOSEAMINOGLICANES INHIBITORY INFLUENCE ON THE TRIPSINE PROTEOLYTIC ACTIVITY

K. L. ERZINKYAN

The influence of glycoseaminoglicanes (heparine, chondroitinesulphate, hialuronic acid) on the tripsine proteolytic activity in pH 8,0 medium has been investigated by microcalorimetric and ultraviolet (UV) differential method. Their inhibitory influence on the tripsine proteolytic activity has been revealed, which in case of the glycoseaminoglicanes presence is the result of tripsine inactivation strengthening in alkaline medium. This process depends on the glycoseaminoglicanes ability of making changes in tripsine molecule.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Миргородская О. А., Иванова Г. И., Пахарин Е. Ф., Москвичев В. В. Биорганическая химия, 2, 1695, 1976
2. Мосолов В. В. Биохимия, 30, 3, 597, 1966
3. Мосолов В. В. Протеолитические ферменты, 72, М., 1971
4. Смотров И. А., Полубоков В. А. Актуальные вопросы гастроэнтерологии, 2, 9, 110, 1976.
5. Хомутоцкий О. А., Дестярева И. И. Ультраструктура слизистой желудка при язвенной болезни, 278, Киев, 1978.
6. Beezer A. E., Lyrell J. H. V. Sci Tools, 19, 13, 1972.
7. Blak R. B., Roberts G., Rhodes I. Yut, 12, 552, 1971
8. Jrankel—Caurat N., Bean R. S. et al. J. Biol. Chem., 177, 385, 1949.
9. Hershkovits T. Method in Enzymology, 11, 748, 1967.
10. Sekino T., Nurata K., Saito Y. et al. Digestiku, 16, 1—7, 28, 1977.
11. Smittle L. B., Farke A. et. et. Nature, 218, 343, 1968.