

УДК 577.152.344:577.151.042

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМА ИНГИБИРУЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ ГЛИКОЗАМИНОГЛИКАНОВ НА ПРОТЕОЛИТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ПЕПСИНА

К. Л. ЕРЗНИКЯН, В. А. ТРАПКОВ, А. В. САГАТЕЛЯН

Изучено влияние гепарина, хондроитинсульфата и гиалуроновой кислоты на протеолитическую активность пепсина. Установлено ингибирующее действие гликозаминогликанов на активность фермента в кислой среде, возрастающее с повышением их концентрации в реакционной смеси. Показано также, что ингибирование протеолитической активности пепсина обусловлено снижением эффективной концентрации субстрата—альбумина—в растворе вследствие его связывания с гликозаминогликаном.

Ключевые слова: пепсин, альбумин, гепарин, хондроитинсульфат, гиалуроновая кислота.

Формирование патологического процесса в слизистой желудка и двенадцатиперстной кишки связано с нарушением баланса между агрессивными свойствами желудочного сока, дуоденального содержимого и резистентностью гастродуоденальной стенки.

Среди агрессивных факторов воздействия на слизистую гастродуоденальной стенки важная роль принадлежит протеолитическому ферменту желудочного сока—пепсину. Патогенное действие пепсина обусловлено его способностью при ослаблении защитного барьера гастродуоденальной стенки повреждать соединительную ткань слизистой посредством переваривания белков [7].

В состав защитных веществ, предохраняющих гастродуоденальную стенку от воздействия агрессивных факторов, входят гликозаминогликаны слизистой—хондроитинсульфат, гиалуроновая кислота и другие гепариноподобные вещества [1, 6].

В ранее проведенном исследовании [3] нами было показано, что одним из механизмов защитного физиологического действия гликозаминогликанов гастродуоденальной стенки может являться их способность усиливать процесс самопереваривания трипсина. В настоящей работе с целью дальнейшего выяснения природы защитного физиологического действия гликозаминогликанов гастродуоденальной стенки изучено их влияние на протеолитическую активность пепсина.

Материал и методика. В работе использованы препараты пепсина (Сигма, США), альбумина из сыворотки крови человека (Реанал, Венгрия), гепарина (Слофа, Чехословакия), хондроитинсульфата («Серва», ФРГ) и гиалуроновой кислоты («Рехим», СССР).

Определение протеолитической активности пепсина в присутствии гепарина и хондроитинсульфата проводили в растворе HCl—KCl (pH 2,0, ионная сила 0,15), а в присутствии гиалуроновой кислоты—в цитратном буфере (pH 4,0, ионная сила 0,15). Для этих целей был использован модифицированный метод Ханта [4], основанный на электрофотометрическом определении количества образовавшегося в процессе гидроли-

за сывороточного альбумина тирозина, которое и служит критерием протеолитической активности пепсина.

Спектрофотометрические измерения выполнены на приборе «Спекорд М 40», в термостатированных при 25° 1-сантиметровых кюветах.

Результаты и обсуждение. На рис. 1 представлены кривые зависимости протеолитической активности пепсина от содержания гепарина, хондроитинсульфата, а на рис. 2 — от содержания гиалуроновой кислоты в реакционной смеси для различных концентраций субстрата — сывороточного альбумина.

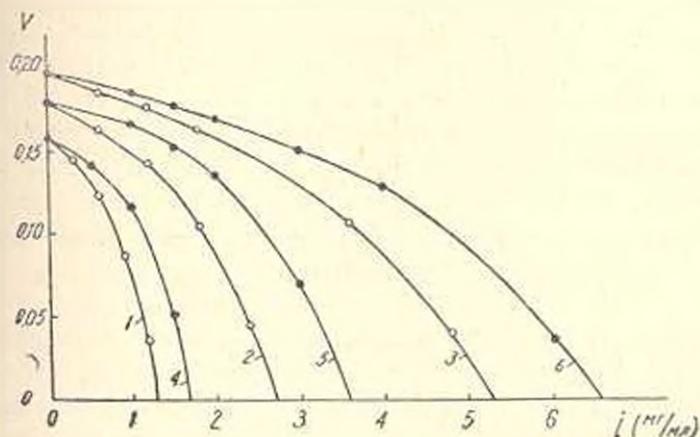


Рис. 1. Зависимость протеолитической активности пепсина в единицах прироста оптической плотности от содержания гепарина (кр. 1, 2, 3) и хондроитинсульфата (кр. 4, 5, 6) при различных концентрациях сывороточного альбумина; для кр. 1 и 4—1 мг/мл; 2 и 5—8 мг/мл; 3 и 6—16 мг/мл (рН 2,0).

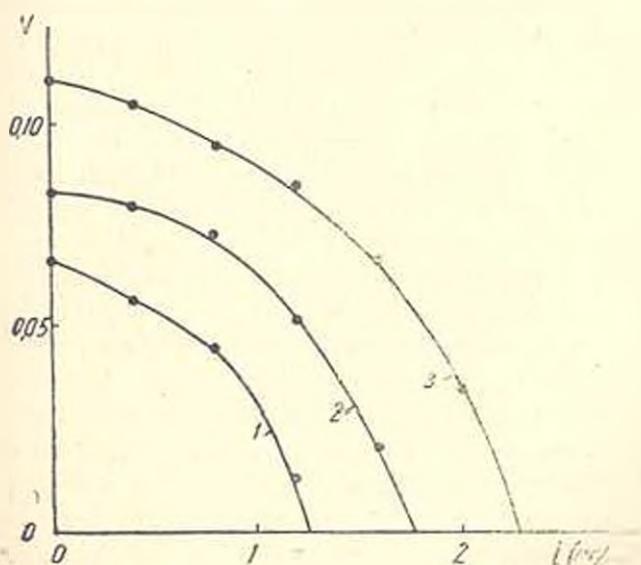


Рис. 2. Зависимость протеолитической активности пепсина в единицах прироста оптической плотности от содержания гиалуроновой кислоты при различных концентрациях сывороточного альбумина; для кр. 1—2,4 мг/мл; 2—3,2 мг/мл; 3—4,8 мг/мл (рН 4,0).

Как видно из приведенных рисунков, гликозаминогликаны оказывают ингибирующее действие на протеолитическую активность пепсина: увеличение концентрации гепарина, хондроитинсульфата, гиалуроновой кислоты в реакционной смеси приводит к снижению скорости (V) расщепления альбумина ферментом.

Экстраполяция кривых в область низких значений протеолитической активности пепсина до пересечения с осью абсцисс дает величины критических концентраций ингибиторов ($I_{кр.}$) для различных концентраций субстрата (S_0), при которых имеет место полное угнетение реакции гидролиза альбумина ферментом. Следует отметить, что величина $I_{кр.}$ прямо пропорциональна содержанию субстрата в реакционной смеси, т. е. отношение величины $I_{кр.}$ к исходной концентрации альбумина S_0 для каждого гликозаминогликана является константой K , не зависящей от концентрации субстрата. Для гепарина величина K равна 0,33, хондроитинсульфата—0,43, гиалуроновой кислоты—0,52. Сравнение показывает, что для полного ингибирования в среде с pH 2,0 протеолиза альбумина пепсином, независимо от концентрации субстрата, требуется меньше гепарина, чем хондроитинсульфата.

С целью выявления характера торможения активности пепсина гликозаминогликанами были получены зависимости Лайнувера-Бэрка ($1/v-1/s$) и Диксона ($1/v-1$) [2]. Их анализ показал, что ингибирование активности пепсина как гепарином, так и хондроитинсульфатом и гиалуроновой кислотой обусловлено снижением эффективной концентрации субстрата в растворе.

Полученные результаты, касающиеся механизма ингибирования, согласуются с литературными данными об угнетении протеолитической активности пепсина соединениями анионной природы [5].

Наблюдаемые изменения активности пепсина под действием гликозаминогликанов можно объяснить следующим образом.

При pH 2,0 суммарный заряд молекул пепсина (pI около 1,0), хондроитинсульфата и гепарина (pK сульфогруппы порядка 1, 2) отрицателен. Аналогичная ситуация реализуется для молекул гиалуроновой кислоты при pH 4,0 (pK карбоксильных групп 3,3). В этих же условиях суммарный заряд молекул альбумина положителен (pI 5,3). При введении в реакционную смесь гликозаминогликанов часть молекул субстрата становится недоступной для гидролиза пепсином, ввиду электростатического взаимодействия альбумина с гликозаминогликанами.

В пользу предложенного механизма угнетения протеолитической активности пепсина свидетельствуют данные, полученные при изучении влияния пепсина на реакцию метакромазии толудинового синего (ТС) с гликозаминогликанами. Гепарин (хондроитинсульфат) и гиалуроновая кислота образуют соответственно при pH 2,0 и pH 4,0, ионной силой 0,15 слабый метакроматический комплекс с ТС, вследствие ориентации молекул (катионов) красителя относительно анионных групп гликозаминогликанов. Добавление пепсина к смеси ТС—гликозаминогликан не приводило к исчезновению метакромазии, что указывает на не-

способность пепсина вытеснять краситель из комплекса ввиду отсутствия его взаимодействия с гликозаминогликанами.

На основании полученных результатов можно предположить следующий механизм защитного физиологического действия гликозаминогликанов. Отрицательно заряженные молекулы гликозаминогликанов, способные образовывать в области кислых значений pH комплексы с белковыми компонентами слизистой, образуют слой отрицательного заряда большой плотности, который уменьшает скорость диффузии пепсина к гастродуоденальной стенке из-за электростатического отталкивания отрицательно заряженных молекул фермента и стерических факторов.

НИИ по биологическим испытаниям химических соединений.

Купавна, Московская область

Поступило 14.XI 1984 г.

ՊԵՊՍԻՆԻ ՊՐՈՏԵՈԼԻՏԻԿ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՎՐԱ ԳԼԻԿՈԶԱՄԻՆՈԳԼԻԿԱՆՆԵՐԻ ԱՐԳԵԱՆՈՎ ԱԶԿԵՅՈՒԹՅԱՆ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆԸ

Կ. Լ. ԵՐԶԻՆԿՅԱՆ, Վ. Ա. ՏՐԱՊԿՈՎ, Ա. Վ. ՍԱԳՊԵԼԻԱՆ

Ուսումնասիրված է հեպարինի, խոնդրոսոլինսուլֆատի, հիալուրոնային թթվի ազդեցությանը պեպսինի պրոտեոլիտիկ ակտիվության վրա: Հաստատվել է թթվային միջավայրում ջլիկոզամինոգլիկանների արդելակող ազդեցությանը ֆերմենտի ակտիվության վրա: Երևում է, որն ուժեղանում է ռեակցիայի խառնուրդում նրանց կոնցենտրացիայի ավելացման դեպքում:

Ցույց է արվում, որ պեպսինի պրոտեոլիտիկ ակտիվության սարգևակումը պայմանավորված է արդյունավետ կոնցենտրատի' արումների լուծույթի մեջ պակասեցումով (իջեցումով, քչացումով)՝ զլիկոզամինոգլիկանների նեո կապի հետևանքով:

STUDY OF THE INHIBITORY ACTION MECHANISM BY GLICOSEAMINOGLICANES ON THE PEPSINE PROTEOLYTIC ACTIVITY

K. L. YERZINKIAN, V. A. TRAPKOV, A. V. SAGHATELIAN

The influence of heparine, chondroitinesulphate and hialuronic acid on the proteolytic activity of pepsine has been studied. The inhibitory action of glicoseaminoglicanec on the enzyme activity in acid medium, increasing with the raise of their concentration in reactionary mixture has been established. The inhibition of proteolytic activity of pepsine is conditioned by the decrease of effective concentration of substrate-albumin in solution, as the result of its connection with glicoseaminoglicanec.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Геллер Л. И. Желудочная секреция и механизмы ее регуляции у здорового человека. 94, 11., 1975.

2. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты 389, М., 1982.
3. Ершакян К. Л. В сб.: Проблемы калориметрии и химической термодинамики (докл. X Всесоюзн. конф.), 2, 159, 1984.
4. Hunt J. N. Biochem J, 12, 1, 104, 1948.
5. Nagashima R., Joshida N., Teran N. Arzneim. Forsch., 30, 1, № 1, 73, 1980.
6. Sekino T., Nurata K., Saito J. et al. Digestion, 16, 1—2, 28, 1977.
7. Taylor W. Multiple forms Enzymes I Leonor—Michaells, Symp., 79, Basel, 1982.

«Биолог. ж. Армении», т. XXXVIII, № 2, 1985

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 581.9(479.25)

НОВЫЙ РОД И РЕДКИЕ ВИДЫ ДЛЯ ФЛОРЫ АРМЕНИИ

Э. Ц. ГАБРИЭЛЯН, К. Г. ТАМАНЯН

Ключевые слова. флора Армении, новые и редкие виды.

В заметке приводятся новые флористические находки, собранные во время многочисленных экспедиционных поездок по Армении. Особо следует отметить экспедицию в Ноемберянский и Иджеванский районы, совершенную в сентябре, во время которой был собран целый ряд новых и интересных растений. Некоторые из них приводятся ниже.

Ambrosia artemisiifolia L. — Новый род для Армении. Этот сорняк обнаружен нами в Северной Армении в Иджеванском районе между с. Куйбышев и Иджеваном, на правом берегу реки Агстев, на горе Беджаниял 6.9.1983 г. Э. Габриэлян, К. Таманян (ERE, 122971, 122975). Занесенный из Америки в Европу вместе с семенами клевера и новых технических культур, он распространился в СССР в районе Запорожья, в окр. Киева, на Северном Кавказе, в Восточном Закавказье (Шекнинское нагорье) и на Черноморском побережье Кавказа в окрестностях Сухуми, Гагры, Пицунды и в других местах [3]. Один из авторов заметки в течение нескольких лет наблюдал, как вначале небольшая, довольно редкая популяция *Ambrosia artemisiifolia* в Гагринском районе в окр. с. Алахадзе и близ Пицунды успешно завоевывала все побережье, постепенно вытесняя интересные типично средиземноморские литоральные виды, такие, как *Ranunculum maritimum* (красивейшую приморскую лилию), не менее красивый крупный вид *Calystegia soldanella*, желтый мачок *Chaetium flavum*, *Medicago marina*, *Cactile maritima*, *Eryngium maritimum* и др. Через несколько лет она захватила все свободное прибрежное пространство. Растения в этой огромной густой популяции очень варьировали от совершенно голых светло-зеленых до густо-мохнато-белоопушенных (ERE 34753, 34754, 54416—54418).

Hypericum elaeopogae Jelen. — Новый для Северной Армении вид. Собран в Иджеванском районе, в окрестностях Иджевана, близ вершины известняковой горы Аггай, на скалах, на высоте 2100—2200 м над ур. м. 7.9.1983 г. Э. Габриэлян (ERE, 122990). Очень редкое расте-