ВЛИЯНИЕ ФРАКЦИЙ ГИДРОЛИЗАТА ПЕПСИНОГЕНА НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ КРЫС

Л.Саидбаева, Ф.М.Топилова, Г.М.Дустматова

Протеолитик ферментлар ҳазм қилиш жараёнида асосий ҳазм безларида фермент ажларилиши бошқарилишида иштирок этади. Ушбу полипептидларнинг хусусиятларини ўрганиш натижасида, улар биологик актив моддалар эканлиги ва меъда шиллиқ қаватида пепсин биосинтезини стимулловчи эканлиги аниқланди.

***Калит сўзлар**: пепсин, пепсиноген, биосинтез, ингибитор, жигар митохондрияси, пептидлар, протеолиз.*

Протеолитические ферменты участвуют в процессах гидролиза и в регуляции ферментовыделения главных пищеварительных желез. Продукты гидролиза пепсиногена обладают физиологическими и фармакологическими эффектами. Было изучены и выделены пептидные продукты протеолиза пепсиногена и влияние этих фракций на деятельность главных желез желудка.

***Ключевые слова**: пепсин, пепсиноген, биосинтез, ингибитор, митохондрия печени , пептиды, протеолиз.*

The article states that proteolyses enzymes besides participation in processes of hydrolysis participate also in regulation of enzyme- secretors digestive activity of the main digestive glands. It is shown that similar property mixture of polypeptides of the pepsinogen medicines which are formed when receiving on technology which cornerstone the principle of an autolysis. As a result of studying of properties of these polypeptides it is revealed that they are biologically active agents which stimulate biosynthesis of pepsin in a mucous membrane of a stomach.

***Key words:** pepsin, pepsinogen, biosynthesis, inhibitor, liver mitochondrion, peptides, proteolysis.*

Протеолитические ферменты, кроме участия в процессах гидролиза, участвуют и в регуляции ферментовыделительной пищеварительной деятельности главных пищеварительных желез. Показано также, что подобным свойством обладает смесь полипептидов, образующихся при получении препаратов пепсиногена по технологии, в основе которой лежит принцип аутолиза. В результате изучения свойств этих полипептидов выявлено, что они являются биологически активными веществами, которые стимулируют биосинтез пепсина в слизистой оболочке желудка.

Следует отметить, однако, что механизм активации пепсиногена остаётся невыясненным и до настоящего времени, так как пока никому из исследователей не удалось изучить этот процесс отдельно от сопутствующего протеолиза.

Работами Van Vunakis и Herriott было показано, что при превращении пепсиногена в пепсин происходит расщепление 9 пептидных связей, что сопровождается отцеплением ингибитора пепсина и ёще ряда пептидов [24]. Ими был выделен ингибитор пепсина и были изучены его свойства. Кроме ингибитора пепсина в процессе активации пепсиногена авторы наблюдали освобождение ещё пяти пептидов. Являются ли эти пептиды первичными продуктами активации или образуются в результате сопутствующего протеолиза – ещё не установлено.

Ввиду того что выделение пептидов протеолитических ферментов сопряжено со значительными трудностями не только технического характера, но и в связи со свойствами самих зимогенов, вопрос о роли их в организме продолжает оставаться нерешенным, несмотря на очевидную важность и необходимость его изучения.

Хотя в гидролизе белков в желудке пепсиногену принадлежит ведущая роль, в литературе мы не встречали работ об участии в пищеварении фрагментов, образованных в результате протеолитической деградации молекулы зимогена.

Небольшое число приведённых данных позволяет допустить, что продукты гидролиза пепсиногена могут обладать достаточно широким спектром физиологических и фармакологических эффектов. К этому допущению склоняется и то, что структура и молекулярная масса пептидов пепсиногена напоминает некоторые регуляторные пептиды.

В связи с изложенным, нами были выделены пептидные продукты протеолиза пепсиногена и

изучено влияние этих фракций на деятельность главных пищеварительных желез и диурез [3]. Кроме того, большой интерес представляло изучение роли этих веществ во внутриклеточных метаболических процессах, в частности, их влияния на жизнедеятельность митохондрий печени крыс.

Известно, что роль митохондрий в животных клетках состоит в том, что они поставляют практически всю необходимую клеткам энергию, источником которой служит окисление различных соединений, так называемых субстратов цикла Кребса.

Проблема энергетического обмена тесно связана с обменом неорганического фосфата. В последнее время фосфорилирование стало привлекать внимание исследователей и в другом аспекте – в связи с энергетическими потребностями самих митохондрий.

В доступной нам литературе не были встречены работы, касающиеся влияния продуктов гидролиза зимогенных протеиназ, в частности, фракций гидролизатов пепсиногена на функциональную активность митохондрий печени крыс. Митохондрии взяты как модель для изучения принципиальной возможности влияния гидролизатов пепсиногена на клеточный метаболизм.

Методика.

Фракции гидролизатов пепсиногена, не обладающие протеолитической активностью были выделены методом гель электрофореза.

Выделение митохондрий печени проводилось методом дифференциального центрифугирования. Скорость дыхания при различных метаболических состояниях и параметры сопряжения митохондрий печени крыс исследовали полярографическим методом с вращающимся платиновым электродом.

Использовались следующие среды инкубации: 0,15М сахароза, 15мМ KCl, 5мМ KH2PO4 , pH 7,4. В качестве субстрата окисления использовали сукцинат 10мМ. Акцептором фосфата служила АДФ в концентрации 200мкмоль на пробу. Реакцию начинали добавлением в ячейку измерения суспензии митохондрий. Для активации митоходриальной АДФ, отцепляющей от АТФ неорганический фосфат, использоовали 2,4-ДНФ.

Добавление в ячейку суспензии митохондрий позволяет регистрировать наличие “Эндогенного дыхания”. Если его нет, то скорость дыхания лимитируется концентрацией добавляемого субстрата окисления, скорость которого резко активируется (V субстратное). Внесение в реакционную смесь АДФ вызывает немедленную активацию дыхания (V3) . При состоянии V3 скорость дыхания ограничивается только интенсивностью поглощения кислорода в присутствии субстратов окисления и фосфорилирования. После того как весь добавленный АДФ превратится в АТФ дыхание вновь затормозится. Это – состояние 4 (V4). В этих условиях потребление кислорода может быть активировано добавлением АДФ.

Фракции гидролизата пепсиногена в инкубационную среду добавлялись в количестве 15 и 30 мкг/кг. Скорость дыхания митохондрий выражалась в нанограммах кислорода, поглощенного за 1 мин. в расчете на 1 мг. белка.

Дыхательный контроль (ДК) определяли как отношение скорости поглощения кислорода митохондриями, находящимися в состоянии 3, к скорости поглощения ими кислорода в состоянии 4 (V3/ V4) .

Коэффициент АДФ/О рассчитывали как отношение количества добавленного АДФ к количеству кислорода, поглощённого митохондриями от момента добавления АДФ до снижения скорости дыхания. Опыты проведены на 30 крысах. Было изучено действие I, II, III и IV фракций гидролизата пепсиногена, статическая обработка данных методом Стьюдента-Фишера проведена из расчета на 100мг. веса животного.

Полученные результаты и их обсуждение.

Из данных экспериментов видно, что введение исследованных фракций гидролизата пепсиногена вызывало определённую перестройку энергетических процессов в митохондриях. Все фракции изменяли дыхание митохондрии печени в различных метаболических состояниях. Так, I фракция снижала скорость дыхания в состоянии V3 (фосфорилирующее дыхание) и повышала его состояние V4 (состояние покоя), что приводило к снижению дыхательного контроля (табл. 1).

Таблица 1

Действие различных фракций пепсиногена на скорость окисления и окислительное фосфорилирование митохондрий печени крыс (скорость дыхания выражена в ммк атомах кислорода, поглощённого за 1 мин. в расчёте на 1 мг. белка, М±м)

Фракции гидролизата	Дозы фракций (мкг/кг)	Скорость дыхания			ДК	АДФ/О
		V3	V4	VДНФ		
I	0 15 30	110±10 106±12 106±14	37±3 37±4 40±5	152±131149±15 145±14	3,0±0,1 2,9±0,1 2,7±0,1	1,7±0,10 1,7±0,12 1,6±0,14
II	15 30	87±7 65±5	34±2 33±3	128±10 109±8	2,6±0,1 1,9±0,1	1,7±0,09 1,5±0,07
III	15 30	102±8 82±6	37±4 36±5	145±11 122±7	2,8±0,1 2,3±0,1	1,7±0,10 1,6±0,08
IV	15 30	75±5 62±4	33±2 32±3	123±6 94±5	2,3±0,06 1,0±0,05	1,6±0,09 1,2±0,07

Примечание: V3 - скорость фосфорилирующего дыхания; V4 – состояние покоя; VДНФ – ДФН –активируемое дыхание; ДК- коэффициент дыхательного контроля; АДФ/О- коэффициент фосфорилирования;

После введения II и IV фракций гидролизата пепсиногена наблюдалось уменьшение скорости потребления кислорода в присутствии субстратов окисления и фосфорилирования, соответственно отмечалось снижение коэффициента дыхательного контроля (ДК). Такие изменения под влиянием малых доз (15 мкг/кг) II и IV фракций не сопровождались существенными изменениями отношения АДФ/О (коэффициент фосфорилирования), в то время как большие дозы (30 мкг/кг) вызывали значительное уменьшение этого показателя.

Несколько иная картина наблюдалась после введения III фракции гидролизата пепсиногена. Под влиянием малой дозы этой фракции скорость фосфорилирующего (V3) и ДНФ-активируемого (VДНФ) дыхания существенно не отличалась от контрольных значений. При этом снижался ДК, а отношение АДФ/О не изменилось. Под действием большой дозы этой фракции вместе с уменьшением показателей скорости дыхания и ДК произошло уменьшение отношения АДФ/О.

Анализируя полученные результаты, можно заключить, что малые дозы I, II, и III фракций не изменяли скорость фосфорилирования, большие дозы вызывали её незначительное уменьшение. Обе дозы IV фракции изменяли коэффициент фосфорилирования, причем значительное уменьшение наблюдалось после введения больших доз. Под действием этой фракции отмечалось и наибольшее подавление (39%) величины ДК. В концентрации 30 мкг/кг белка, что сопровождалось уменьшением (30%) отношения АДФ/О. действие IV фракции гидролизата пепсиногена приводило к повышению скорости окисления и изменению эффективности окислительного фосфорилирования.

Таким образом, как следует из наших данных, выраженность эффекта действия фракций гидролизата пепсиногена зависит от их концентрации. Кроме того, во всех проведённых экспериментах наблюдалось уменьшение скорости фосфорилирующего и ДНФ-стимулирующего окисления митохондрий, что приводило к снижению отношения АДФ/О и ДК. Наиболее общим эффектом фракций на энергообеспечивающие реакции митохондрий печени было снижающее его действие на скорость метаболических реакций митохондрий.

Известно, что величина ДК позволяет судить о степени сопряжённости препарата митохондрий, выделенного в различных условиях опыта, величина ДК может меняться от 1 (ДК отсутствует) до 8-10 (прочно сопряжённых митохондрий). У «прочно сопряжённых» интактных митохондрий зависимость интенсивности дыхания от АДФ выражена наиболее сильно «Лабильно сопряжённые» митохондрии характеризуются слабо выражённой зависимостью интенсивности дыхания от АДФ. При изменении нормальной структуры митохондрий, в присутствии разобщителей или детергентов степень активации дыхания экзогенной АДФ уменьшается или исчезает, что обусловлено нарушением сопряжения окисления с фосфорилированием.

В наших опытах под влиянием введённых препаратов фракций гидролизатов пепсиногена наблюдаемое уменьшение ДК позволяет судить об изменении сопряжённости митохондрий, то есть после введения этих веществ зависимость интен-

сивности дыхания митохондрий от АДФ уменьшилась.

Полученные результаты позволяют сделать предположение о некоторых особенностях компенсаторно-приспособительных процессов, происходящих в митохондриях печени в условиях действия изученных фракций гидролизатов пепсиногена. На данном этапе ещё трудно представить себе полный механизм действия продуктов гидролиза зимогенов на скорость метаболических реакций митохондрий. Известно, что реакции освобождения и аккумуляции энергии могут регулироваться многими факторами, в том числе путем изменения каталитических свойств фермента (активации и торможения фермента).

Роль веществ регуляторов, контролирующих действие механизмов энергообеспечения, могут выполнять субстраты и продукты регулируемых реакций, их отдалённые метаболиты и предшественники, а также соединения, специализирующиеся на выполнении регуляторных функций: гормоны, внутриклеточные, физиологически активные вещества и др [4]. Возможность такой регуляции мы моделировали влиянием выделенных нами фракций на митохондрии печени крыс.

На основании вышеизложенного можно отметить, что малые дозы исследованных фракций, уменьшая потребление кислорода в различных метаболических состояниях, способствуют протеканию процесса фосфорилирования в обычном для его состояния режиме, т.е. с меньшими затратами энергии. Это позволяет заключить, что в осуществлении регуляторных свойств исследованных фракций гидролизата пепсиногена определённую роль играют и некоторые факторы внутриклеточной жизнедеятельности.

Литература:

1. Сторожук П.Г., Быков И.М., Литвинова Т.Н. Полипептиды, выделенные из слизистой оболочки желудка, их действие на биосинтез пепсина железами желудка. // Бюлл. Эксперим.биол и мед.-1981-Т.91, №8-40-42б.

2. Van Vunakis H, Herriott R. Structural changes associated with the conrersiol of pepsinogen to pepsin. 11. The N-terminal amino asid residues of pepsin and pepsinogen; the amino asid composition of pepsinogen.// Biochim. Biophys. Acts.-1957.Vol.23,№23-p600-608.

3. Коротько Г.Ф., Саидбаева Л.М. Продукты гидролиза пепсиногена как регуляторы секреторной деятельности пищеварительных желёз.// Физиол. журнал СССР. 1982.-№4.- С.463-468

4. Скулачев В.П. Аккумуляция энергии в клетке. // М.: Наука.-1969.- 439 с.

Андижон давлат университети,
2016 йил 12 январда қабул қилинган
(Тақризчи: доц. Э.Халилов)