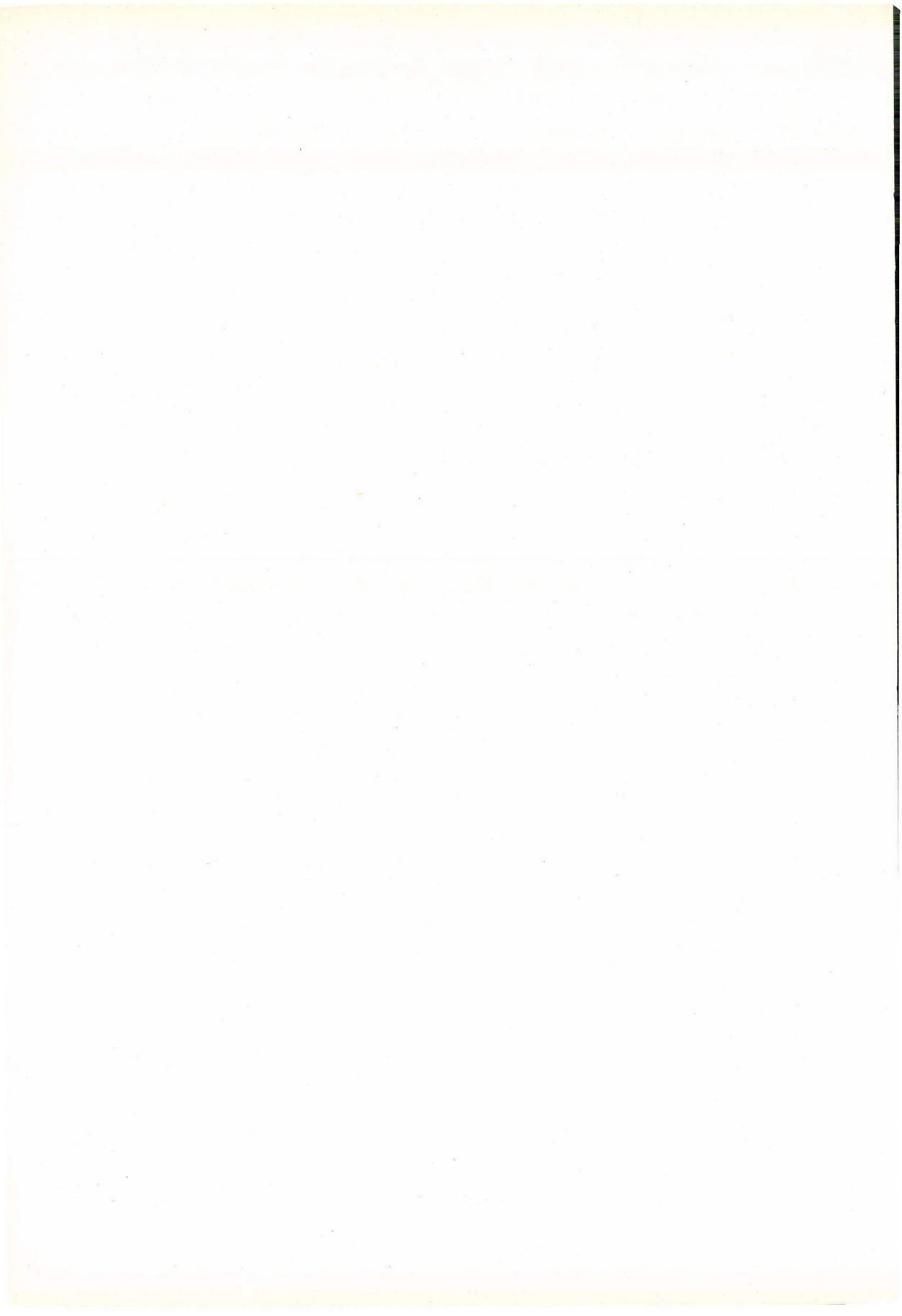




AZ ENTEROKINÁZ IN VITRO GÁTOLHATÓSÁGA KOLOSZTRUM TRIPSZIN-INHIBITORRAL

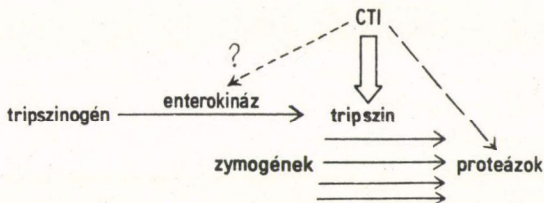
IFJ. BAINYNER KÁROLY

Állattenyésztési Kutató Intézet. Élettani és Szaporodásbiológiai Főosztály, Budapest

LASKOWSKI és LASKOWSKI (1951) a koca kolosztrumában nagy mennyiségű, polipeptid természetű tripszin-gátlót talált. Korábbi vizsgálatainkban (BAINYNER, 1973) kimutattuk, hogy az újszülött malacok béltartalmának kolosztrum-eredetű tripszin-gátló (CTI) koncentrációja igen nagy az élet első kb. fél napjában, proteolitikus enzimeket pedig nem lehet ilyenkor kimutatni. Ugyanebben az időszakban a legnagyobb mértékű az emésztetlen fehérjék (köztük az immunglobulinok) felszívódása a vékonybélben.

A CTI a vékonybélben előforduló enzimek közül a tripszint gátolja a legkifejezettebben, kevésbé az α -kimotripsint és csak egészen enyhén a kimotripszin B-t (WU és LASKOWSKI, 1960). Hatástalan viszont a kimotripszin-családba tartozó többi enzimre (BAINYNER, 1973) és az elasztolitikus aktivitást sem képes kifejezetten csökkenteni (közvetlen vizsgálatok). Felmerült ezért a kérdés, hogy a születés utáni első fél nap proteolízis-nélkülinek látszó időszakában a malacok hasnyál szekréciója hiányzik-e vagy pedig a bélbe jutott proteáz-előenzimek (zymogének) aktiválódása marad-e el. Előző vizsgálataink (BAINYNER, 1973) inkább a második lehetőséget támogatják. Ez viszont azt a további kérdést veti fel, hogy melyik az a lépés, ahol a CTI megakadályozza a zymogének aktiválódását.

Kifejlett állatokban a zymogének aktiválódása 2 lépésben megy végbe: Amikor a hasnyál a béllumenbe ürül, érintkezésbe kerül a bélhám felületén levő enterokinázzal (EK), amely a hasnyál tripszinogénjét tripszinné alakítja; a keletkező tripszin pedig aktiválja a többi zymogént. Az aktiválódási folyamat megindulása után egyes enzimek (pl. a tripszin és a karboxipeptidáz A) eseté-



ben az aktiválódás autokatalitikusan is folytatódhat, ez azonban kevésbé jó hatásfokú (KELLER, 1968; GRAY és COOPER, 1971). A CTI ebbe a folyamatba 3 helyen avatkozhat be: Az EK gátlásával, a tripszin gátlásával, illetve a többi proteolitikus enzim gátlásával.

Mivel a CTI lehetséges hatásai közül az enterokináz CTI általi gátlására vonatkozóan irodalmi adatot nem találtam, ezért megvizsgáltam a CTI- és összehasonlításképpen az STI (szója tripszin-inhibitor) hatását az EK-aktivitásra.

Módszerek

Az EK-aktivitás vizsgálatát megnehezítette az a tény, hogy az EK egyedül a tripszinogént bontja megfelelő gyorsasággal, és hogy a tripszinogénből az EK hatására keletkező tripszint mind az STI, mind pedig a CTI gátolja. Ezért indirekt módszerek váltak szükségessé annak megállapítására, hogy a gátlók csupán a tripszint vagy a tripszin mellett az enterokinázt is gátolják-e.

Az EK-aktivitást azon az alapon követtem, hogy a hozzáadott tripszinogénből milyen ütemben jelenik meg a tripszin-aktivitás. A tripszin aktivitását SCHWERT és TAKENAKA (1955) szerint mértem, közvetlen spektrofotometriás leolvasással, 253 m μ -nál, szobahőmérsékleten, 0,1 molos, pH 8-as Tris · HCl pufferben. Szubsztrátként benzoil-arginin etilésztert (BAEE) használtam. A 10 mg/30 ml-es BAEE törzsoldathból 0,5 ml-t tettem az összesen 3 ml-es mérőelegybe.

A használt vegyszerek és oldataik a következők voltak:

tripszinogén (Fluka, kristályos) 2 mg/ml;

enterokináz (Calbiochem, B grade, >20 ECU/mg), ugyanolyan mennyiségű Na-dezoxikolat és kevés pH 8-as Tris puffer segítségével feloldva, 0,125 mg/ml névleges koncentrációban; szója tripszin-inhibitor (Reanal);

CTI, első fejésű tehén kolosztrumból LASKOWSKI és LASKOWSKI (1951) módszere szerint részlegesen tisztítva.

A kísérlet elvégzésére a 8-as pH-t választottam, amelynél mind az EK, mind pedig a tripszin erősen aktív. Zavaró hatást jelentett, hogy ennél a pH-nál legalább 3 másik reakció is végbemegy:

1. a tripszin autokatalitikus aktiválódása;
2. a tripszinogén $\xrightarrow{\text{tripszin}}$ „inert protein” reakció;
3. a tripszin önemésztése.

Ezek a mellékreakciók elkerülhetők, ha pH 5 és 6 között dolgozunk (KUNITZ, 1939). Savas pH-nál azonban fokozódik a tripszin-STI komplex diszociációja és ezért az enterokinázzal szemben sem várható gátlás.

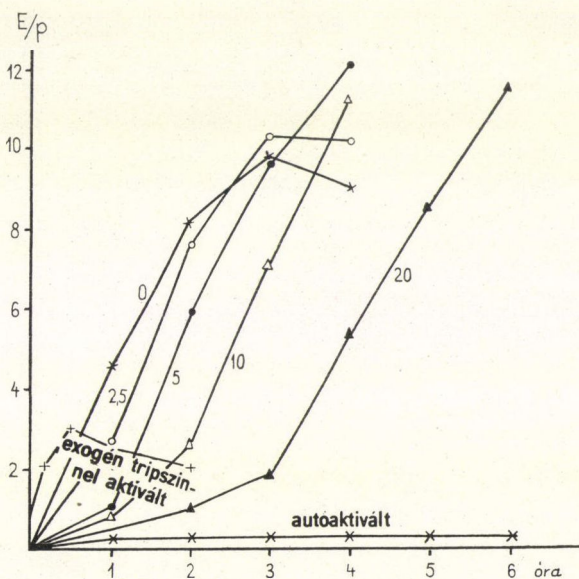
A kísérlet elrendezése a következő volt: Kémcsövekbe 0,1–0,1 ml EK oldatot pipettáztam, amelyhez a kontroll csöveket kivéve 0,1–0,1 ml, különböző mértékben hígított tripszin-gátlót tettem. A térfogatot pH 8-as Tris · HCl

pufferrel 0,9 ml-re egészítettem ki, és végül a reakciót 0,1–0,1 ml tripszinogén oldattal megindítottam. A szobahőmérsékleten inkubált elegyekből különböző időközökben 0,1–0,1 ml-t kivettem és a tripszin-aktivitást meghatároztam.

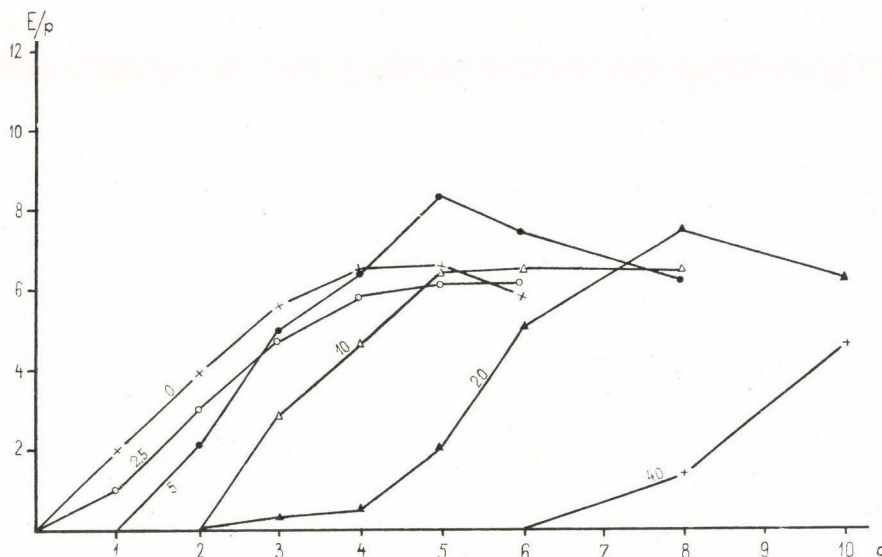
Eredmények és megbeszélés

A kísérletben háromféle kontrollt használtam: Az EK-t és gátlót nem tartalmazó csövekben (1. kontroll) a tripszinogén autokatalitikus aktiválódása már az első órában megindult, de valószínűleg túlnyomórészt „inert protein” keletkezett: a tripszin-aktivitás 6 órai inkubálás után is csak nyomokban volt kimutatható (1. ábra). A 2. kontrollnál a tripszinogént kb. 1 μg tripszinnel aktiváltam. A tripszin-aktivitás gyorsan emelkedett, majd 1/2 óra után csökkenni kezdett (1. ábra). A 3. kontrollnál EK és tripszinogén is volt jelen, de gátló nélkül. A tripszin-aktivitás eleinte egyenletesen, majd lassulva nőtt, és a 3., illetve 5. órában érte el a maximumot (1. és 2. ábra). A kísérleti csövekben tripszin-aktivitást csak akkor lehetett kimutatni, amikor a keletkező tripszin már lekötötte a jelenlevő gátlót.

A gátló koncentráció függvényében történő tripszin megjelenési időpont változásokat az 1. táblázat foglalja össze. A tripszin megjelenésének időpontját úgy határoztam meg, hogy a tripszin-aktivitás növekedésének egyenletes szakaszát grafikusan az időtengelyig hosszabbítottam meg, és a metszéspontot órákban leolvastam (1. és 2. ábra).



1. ábra. A 0, 2,5, 5, 10 és 20 $\mu\text{g/ml}$ STI végkoncentrációk hatása a tripszin-aktivitás megjelenésére az enterokináz-tripszinogén rendszerben. 3–3 meghatározás átlagai



2. ábra. A 0, 2,5, 5, 10, 20 és 40 $\mu\text{g/ml}$ CTI végkoncentrációk hatása a tripszin-aktivitás megjelenésére az enterokináz-tripszinogén rendszerben. 3–3 meghatározás átlagai. E/p = percenként 0,001 extinció változás BAEE szubsztrát mellett

A tripszin-gátló koncentráció csövenkénti növelése következtében a tripszin-gátló egyre inkább feleslegbe kerül az enterokinázzal szemben. A tripszin megjelenési ideje a gátló koncentráció változásával párhuzamosan változott, ami megmagyarázható a gátlónak közvetlenül a tripszinre gyakorolt hatásával (1. tábl.). Egy esetleges EK gátlás esetén a gátló koncentráció növelésekor csökkennie kellene mind a tripszin keletkezés ütemének, mind pedig a gátló eltűnési ütemének, ugyanakkor a tripszin megjelenési időpontnak pedig nem

1. táblázat

A tripszin megjelenési ideje és a tripszin-gátló eltűnési üteme különböző STI és CTI koncentrációknál. (Az enterokináz névleges végkoncentrációja $12,5 \mu\text{g/ml}$.)

	Végcc. ($\mu\text{g/ml}$)	Tripszin megjelenési idő (óra)	A gátló eltűnési üteme ($\mu\text{g/óra}$)
STI	2,5	$\frac{1}{4}$	10
	5	$\frac{1}{2}$	10
	10	1	10
	20	$1\frac{1}{2}$	13
CTI	2,5	$\frac{1}{2}$	5
	5	1	5
	10	2	5
	20	4	5
	40	7	5,7

arányosan, hanem ennél erősebben („hatványozottan”) kellene kitolódnia. A végzett mérések viszont lineáris összefüggésre utalnak (1. táblázat). A lineáristól való kis, jelentéktelen eltérések is inkább a gátlás hiányára, mint meglétére mutatnak. A kísérletekből ezért azt a következtetést vontam le, hogy *az STI és a CTI nem fejt ki jelentős gátló hatást az EK-ra*. A kísérletek indirekt volta miatt azonban enyhe gátlás lehetősége nem zárható ki.

Várható volt, hogy a tripszin-gátló koncentrációk növelésekor nemcsak a tripszin megjelenési ideje tolódik ki, hanem a tripszin aktivitások sem emelkednek olyan magasra. A mérések azonban ellenkezőjét bizonyították: a tripszin-gátló tartalmú csövekben a tripszin-aktivitás maximuma nemcsak, hogy elérte a kontrollét, de azt csaknem minden esetben túl is szárnyalta. Ennek a *paradox hatás*nak a valószínű magyarázata az, hogy a tripszin-gátlók gátolják a másodlagos reakciókat, mégpedig az „inert protein” keletkezést és a tripszin önemésztését. A tripszin-aktivitás maximumát növelő hatás az STI-nél kifejezettebb volt, mint a CTI-nél, ami lehet, hogy összefüggésben van a CTI általi gátlás hosszabb reakció-idejével. A STI-gátlási görbék meredekebb voltát a csaknem 5 °C-kal magasabb szobahőmérséklet okozta.

A kísérletekkel egyidőben MAROUX és mtsai (1971) módszert közöltek, amellyel gyakorlatilag szennyezés-mentes EK-t tudtak előállítani. Megállapították, hogy az EK bontja a BAEE szubsztrátot, bár jóval lassabban mint a tripszin. Tiszta EK készítmény és BAEE szubsztrát alkalmazásával mégis lehetővé vált számukra az EK gátolhatóságának *közvetlen* vizsgálata. Nevezett szerzők ezzel a módszerrel megállapították, hogy az STI, a Kunitz- és a Kazal-inhibitor nem gátolja az EK-t, viszont gátolja a diizopropil fluorofoszfát (DFP) és az α -tozillizin klorometil keton (TLCK). A CTI hatását nem vizsgálták.

Következtetések

A bevezetőben felvetett problémára — tekintetbe véve a korábbi eredményeket is (BAINTNER, 1973) — a következőkben próbálok megválaszolni.

A 1/2 naposnál fiatalabb malacok béltartalmában kimutathatók az olyan emésztő enzimek, amelyek aktiválódást nem igényelnek (lipáz, amiláz). Ez arra utal, hogy a hasnyál szekréciója az első szopás után rögtön megindul. Az a tény, hogy zymogéneket a béltartalom mintákban nem sikerült kimutatni, a metodikai nehézségek miatt nem bizonyító erejű. A CTI az enterokinázt nem gátolja, vagy legalábbis nem jelentősen. Ezért csak az a lehetőség marad fenn, hogy a CTI az enterokináz hatására keletkező tripszin gátlása révén akadályozza meg a zymogének aktiválódását a 1/2 naposnál fiatalabb malacokban.

Az életkor előrehaladásával a CTI koncentrációja a malac béltartalmában erősen csökken, ugyanakkor a hasnyál szekréció feltehetően fokozódik. Úgy látszik, hogy kb. fél napos kor után a CTI már nincs elég nagy feleslegben

a tripszinnel szemben ahhoz, hogy megakadályozhassa a zymogének aktiválódását, mivel a hasnyál és a béltartalom összekeveredésekor valószínűleg csak fokozatosan alakul ki a CTI túlsúlya a tripszinnel szemben. Az emésztés fejlődésének ebben a szakaszában az emésztő enzimek aktiválódása ezért megtörik és csupán a CTI közvetlen gátló hatása érvényesül.

Újabban kimutattuk, hogy az újszülött malacéval analóg módon gátolja a tojásfehérje tripszin-gátlója a fejlődő csirkeembrió vékonybelének proteolitikus aktivitását (BAINNER és FEHÉR, 1974).

Összefoglalás

A szerző *in vitro* tripszinogén-enterokináz rendszerben vizsgálta a különböző koncentrációjú tripszin-gátlók hatását a tripszin megjelenési idejére, pH 8-nál. A kolosztrum- és a szója tripszin-gátló nem volt képes az enterokináz aktivitását kimutathatóan csökkenteni, sőt a szója tripszin-gátló kifejezetten növelte a keletkező tripszin mennyiségét. Feltehető, hogy ennek ellenére *in vivo* a kolosztrum tripszin-gátló az aktivált tripszin gátlása révén képes megakadályozni a hasnyál zymogénjeinek aktiválódását, ha a tripszin-gátló a tripszinnel szemben nagy feleslegben van.

Köszönet

Köszönetemet szeretném kifejezni Said Mahmoudnének a kísérletekben való technikai segítségéért, Miss Campbell-nek az enterokináz készítményért és dr. Berek Géának a tripszin-gátló előállítására használt tehén-kolosztrumért.

IRODALOM

- BAINNER K. ifj.: *Magy. Állatorv. Lapja* **28**, 593 (1973).
 BAINNER K. ifj. és FEHÉR GY.: *MTA Biol. Oszt. Közl.* **17**, 121 (1974).
 GRAY, G. M. és COOPER, H. L.: *Gastroenterology* **61**, 535 (1971).
 KELLER, P. J.: *Pancreatic Enzymes. Handbook of Physiology. Section 5, chapter 122. Am. Physiol. Soc. Washington* (1968).
 KUNITZ, M.: *J. Gen. Physiol.* **22**, 429 (1939).
 LASKOWSKI, M. jr. és LASKOWSKI, M.: *J. Biol. Chem.* **190**, 563 (1951).
 MAROUX, S., BARATTI, J. és DESNUELLE, P.: *J. Biol. Chem.* **246**, 5031 (1971).
 SCHWERT, G. W. és TAKENAKA, Y.: *Biochim. Biophys. Acta* **16**, 570 (1955).
 WU, F. C. és LASKOWSKI, M.: *J. Biol. Chem.* **213**, 609 (1960).