

Marta Siergiejuk, Anna Bańkowska-Luksza¹⁾, Anna Worowska, Marek Gacko

WPLYW INHIBITORÓW PEPTYDAZ NASION ROŚLIN SPOŻYWANYCH PRZEZ CZŁOWIEKA NA AKTYWACJĘ PROKARBOKSYPEPTYDAZ I AKTYWNOŚĆ KARBOKSYPEPTYDAZ TRZUSTKOWYCH

Klinika Chirurgii Naczyń i Transplantacji Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

Kierownik: prof. dr hab. med. *M. Gacko*

¹⁾ Samodzielny Publiczny Zakład Opieki Zdrowotnej w Mońkach

Dyrektor: dr n. med. *A. Bańkowska-Luksza*

Inhibitory peptydaz występujące w ekstraktach z nasion bobu, dyni, fasoli, gorczycy, grochu, gryki, jęczmienia, kukurydzy, maku, owsa, prosa, pszenicy, słonecznika, soczewicy, soi i żyta hamują dokonywaną przez trypsynę aktywację prokARBOKSYPEPTYDAZY A i aktywację prokARBOKSYPEPTYDAZY B. Inhibitory te nie hamują jednak aktywności karbOKSYPEPTYDAZY A i aktywność karbOKSYPEPTYDAZY B w działaniu na specyficzne substraty tych peptydaz.

Hasła kluczowe: inhibitory nasion, karbOKSYPEPTYDAZA A, karbOKSYPEPTYDAZA B.
Key words: seeds inhibitors, carboxypeptidase A, carboxypeptidase B.

ProkARBOKSYPEPTYDAZA A i prokARBOKSYPEPTYDAZA B syntetyzowana jest w komórkach miąższu trzustyki (1). Proenzymy te są aktywowane w soku dwunastniczym przez trypsynę do aktywnej karbOKSYPEPTYDAZY A (EC 3.4.2.1) i aktywnej karbOKSYPEPTYDAZY B (EC 3.4.2.2) (1, 2, 3, 4). KarbOKSYPEPTYDAZA A odszczepia od peptydów i białek aminokwasy C-końcowe, z wyjątkiem Arg i Lys (2). C-końcówką Arg i Lys odszczepia karbOKSYPEPTYDAZA B (3). Aktywność pepsyny, enteropeptydazy, trypsyny i chymotrypsyny jest hamowana przez inhibitory proteinaz występujące w nasionach wielu gatunków roślin (1, 5, 6, 7, 8).

Celem pracy jest ocena wpływu ekstraktu z nasion 16 gatunków roślin spożywanych przez człowieka na aktywację prokARBOKSYPEPTYDAZY A i prokARBOKSYPEPTYDAZY B przez trypsynę oraz na aktywność karbOKSYPEPTYDAZY A i karbOKSYPEPTYDAZY B w działaniu odpowiednio na benzoiloglicylo-L-Phe i benzoiloglicylo-L-Arg.

MATERIAŁ I METODY

Źródłem prokARBOKSYPEPTYDAZY A i prokARBOKSYPEPTYDAZY B był płyn nadosadowy 10% homogenatu trzustyki wieprzowej (9, 10). Odczynnik ninhydrynowy, bufor Tris, kwas trichlorooctowy, Sigma, USA; karbOKSYPEPTYDAZA A, karbOKSYPEPTYDAZA B, trypsyna, Merck, Niemcy; benzoiloglicylo-L-Arg, benzoiloglicylo-L-Phe, benzoilo-Arg-pNA, Bachem, Szwajcaria.

Nasiona bobu właściwego (*Vicia faba major*), dyni olbrzymiej (*Cucurbita maxima*), fasoli zwyczajnej (*Phaseolus vulgaris*), gorczycy jasnej (*Sinapis alba*), grochu siewnego (*Pisum sativum*), gryki zwyczajnej (*Phagopyrum sagittatum*), jęczmienia zwyczajnego (*Hordeum vulgare*), kukurydzy zwyczajnej (*Zea mays*), maku lekarskiego (*Papaver somniferum*), owsa siewnego (*Avena sativa*), prosa zwyczajnego (*Panicum miliaceum*), pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum*), słonecznika zwyczajnego (*Helianthus napus*), soczewicy jadalnej (*Lens culinaris*), soi zwyczajnej (*Soja hispida*) i żyta zwyczajnego (*Secales cereale*) rozdrabniano w młynku mechanicznym i ekstrahowano roztworem NaCl o stęż. $0,15 \text{ mol/dm}^3$ w stosunku 1:9 w/v w ciągu 2 godz. Otrzymany przez wirowanie ($1500 \times \text{g}$, 2°C , 30 min) płyn nadosadowy ekstraktów nasion poszczególnych roślin posiadał pH od 4,98 do 6,27 i zawierał od 0,77 do $3,16 \text{ mg/cm}^3$ białka (4, 11). Płyn ten doprowadzano do pH 7,5 za pomocą roztworu NaOH o stęż. $0,1 \text{ mol/dm}^3$.

W celu oceny aktywności trypsynopodobnej, karboksypeptydazo A i karboksypeptydazo B do $0,3 \text{ cm}^3$ próbek ekstraktu z nasion dodawano odpowiedniego substratu tych peptydaz: $0,1 \text{ cm}^3$ Bz-L-Arg-pNa lub $0,1 \text{ cm}^3$ Bz-L-Phe lub $0,1 \text{ cm}^3$ Bz-L-Arg i inkubowano 30 min w temp. 37°C . Reakcję przerywano przez dodanie 1 cm^3 30% TCA. W otrzymanym przez wirowanie ($1500 \times \text{g}$, 2°C , 30 min) w klarownym płynie nadosadowym mierzono absorbancję przy 410 nm w celu określenia ilości uwolnionej *p*-nitroaniliny (12) lub posłużono się odczynnikami ninhydrynowym w celu określenia ilości uwolnionej fenyloalaniny lub argininy (13).

Wpływ ekstraktów z nasion na aktywację prokarboksypeptydazy A i prokarboksypeptydazy B oceniano trzema testami, pozwalającymi określić obniżenie przyrostu produktów reakcji zależnie od stopnia zahamowania aktywacji proenzymu, stopnia zahamowania aktywności enzymu i stopnia równoczesnego zahamowania obu procesów (10, 12, 13).

Wpływ ekstraktów z nasion na aktywność karboksypeptydazy A oceniano przy użyciu benzoiloglicylo-L-Phe, w pH 7,5 (10, 13). Wpływ ekstraktów z nasion na aktywność karboksypeptydazy B oceniano przy użyciu benzoiloglicylo-L-Arg, w pH 7,5 (13, 14).

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Ekstrakty z nasion badanych roślin nie hydrolizują lub hydrolizują jedynie bardzo nieznacznie syntetyczny substrat trypsyny, którym jest Bz-L-Arg-pNa (tab. I). Nie hydrolizują także syntetycznego substratu karboksypeptydazy A, którym jest Bz-Gly-L-Phe i substratu karboksypeptydazy B, którym jest Bz-Gly-L-Arg. Ekstrakty z nasion wszystkich badanych roślin hamują aktywność trypsyny oznaczaną przy użyciu Bz-L-Arg-pNa (tab. II). Ekstrakty wszystkich badanych nasion hamują aktywację prokarboksypeptydazy A (tab. III) i aktywację prokarboksypeptydazy B (tab. IV), dokonywaną przez trypsynę. Ekstrakt żadnej z badanych nie hamuje aktywności karboksypeptydazy A i aktywności karboksypeptydazy B (tab. V).

Tab e l a I. Aktywność peptydazowa ekstraktu z nasion oznaczana za pomocą substratu trypsyny (Bz-L-Arg-pNa), substratu karboksypeptydazy A (Bz-Gly-L-Phe) i substratu karboksypeptydazy B (Bz-Gly-L-Arg), oceniana w pH 7,5.

Tab e l e I. Peptidase activity of the extract from the seeds as determined by Rusing the trypsin substrate (Bz-L-Arg-pNa), carboxypeptidase A substrate (Bz-Gly-L-Phe) and carboxypeptidase B substrate (Bz-Gly-L-Arg), assessed in pH 7.5.

Nasiona	Aktywność peptydazowa, nmol/cm ³ /30 min		
	pNa	Phe	Arg
Bób	0,0	0,0	0,0
Dynia	1,2	0,0	0,0
Fasola	1,3	0,0	0,0
Gorzycza	3,6	0,0	0,0
Groch	3,2	0,0	0,0
Gryka	2,1	0,0	0,0
Jęczmień	0,0	0,0	0,0
Kukurydza	1,2	0,0	0,0
Mak	3,8	0,0	0,0
Owies	0,0	0,0	0,0
Proso	1,0	0,0	0,0
Pszenica	0,0	0,0	0,0
Słonecznik	2,2	0,0	0,0
Soczewica	2,2	0,0	0,0
Soja	1,0	0,0	0,0
Żyto	1,2	0,0	0,0

Tab e l a II. Wpływ ekstraktów z nasion na aktywność trypsyny oceniany przy użyciu Bz-L-Arg-pNa, w pH 7,5

Tab l e II. Effect of extracts from the seeds of the activity of trypsin evaluated using Bz-L-Arg-pNa in 7,5

Nasiona	Aktywność antytrypsynowa, pNa nmol/cm ³ /30 min (% hamowania)*
Bób	35,2 (44)
Dynia	54,4 (68)
Fasola	28,7 (36)
Gorzycza	25,6 (32)
Groch	32,8 (41)
Gryka	60,0 (75)
Jęczmień	54,3 (68)
Kukurydza	49,6 (62)
Mak	55,6 (69)
Owies	56,8 (71)
Proso	58,2 (73)
Pszenica	54,2 (68)
Słonecznik	18,7 (23)
Soczewica	28,4 (35)
Soja	46,8 (58)
Żyto	36,4 (45)

* – w teście kontrolnym (0,15 mol/dm³ NaCl, pH 7,5) ilość uwolnionej pNa wynosiła 80,0 nmol/cm³ /30 min; aktywność trypsyny bez ekstraktu z nasion przyjęto za 100%.

Tab e I a III. Wpływ ekstraktów z nasion na aktywację prokarboksypeptydazy A przez trypsynę oceniany przy użyciu Bz-Gly-L-Phe w pH 7,5

Table III. Effect of extracts from the seeds in the activation A by trypsin procarboxypeptidase evaluated using Bz-Gly-L-Phe in pH 7.5

Nasiona	test		
	1	2	3
	Phe, nmol/30 min (% hamowania)*		
Bób	278,6 (100%)	172,7 (38)	197,8 (29)
Dynia		175,5 (37)	206,2 (26)
Fasola		124,8 (70)	102,2 (63)
Gorczyca		118,6 (57)	98,6 (65)
Groch		128,4 (54)	104,2 (63)
Gryka		150,4 (56)	175,5 (37)
Jęczmień		110,0 (61)	168,6 (40)
Kukurydza		186,9 (33)	172,4 (38)
Mak		93,8 (66)	82,6 (70)
Owies		210,2 (25)	172,4 (38)
Proso		142,1 (49)	161,6 (42)
Pszennica		198,5 (29)	168,7 (39)
Stonecznik		126,4 (55)	108,3 (61)
Soczewica		124,0 (56)	96,8 (65)
Soja		205,4 (26)	168,7 (39)
Żyto		122,0 (56)	98,6 (65)

* – za 100% aktywności przyjęto wartość uzyskaną w teście 1.

Karboksypeptydaza A i karboksypeptydaza B jest syntetyzowana przez komórki gruczołowe trzustki w postaci proenzymów, a ich aktywatorem jest trypsyna (1). Aktywność trypsynopodobna ekstraktu z nasion oznaczana za pomocą substratu syntetycznego jakim jest Bz-L-Arg-pNa jest bardzo mała. Aktywność trypsynopodobna ekstraktów z nasion oceniana przy użyciu globiny jest także jedynie niewielka (11). Trypsynogen jest aktywowany przez enteropeptydazę (1, 15). Spośród ekstraktów nasion badanych roślin jedynie ekstrakt z nasion fasoli hamuje aktywację trypsynogenu przez enteropeptydazę (16, 17, 18). Ekstrakty z nasion hamują aktywność trypsyny znacznie w działaniu jej na Bz-L-Arg-pNa, jak i w działaniu na globinę (19). Jest to w zgodności z hamowaniem przez trypsynę zarówno aktywacji prokarboksypeptydazy A, jak i aktywacji prokarboksypeptydazy B.

Inhibitory nasion niektórych roślin hamują aktywność karboksypeptydaz o serynowym miejscu katalitycznym (20). Trzustkowa karboksypeptydaza i karboksypeptydaza B są egzopeptydazami o cynkowym miejscu katalitycznym (2, 3). Może to tłumaczyć ich niewrażliwość na działanie inhibitorów karboksypeptydaz serylowych.

Tab e l a IV. Wpływ ekstraktów z nasion na aktywację prokarboksypeptydazy B przez trypsynę oceniany za pomocą Bz-Gly-L-Arg w pH 7,5

Tab l e IV. Effect of extracts from the seeds in the activation B by trypsin procarboxypeptidase evaluated using Bz-Gly-L-Arg in pH 7.5

Nasiona	test		
	1	2	3
	Arg, nmol/30 min (% hamowania)*		
Bób	226,8 (100%)	40,8 (82)	70,3 (69)
Dynia		36,2 (84)	63,5 (72)
Fasola		88,4 (61)	73,8 (68)
Gorczyca		86,1 (62)	108,8 (52)
Groch		117,9 (48)	96,8 (57)
Gryka		31,7 (86)	52,1 (77)
Jęczmień		154,2 (32)	128,2 (44)
Kukurydza		163,2 (28)	130,6 (42)
Mak		34,0 (85)	70,3 (69)
Owies		77,1 (66)	128,4 (43)
Proso		31,7 (86)	58,9 (74)
Pszenica		68,0 (70)	134,2 (41)
Słonecznik		92,9 (59)	156,4 (31)
Soczewica		95,2 (58)	108,4 (52)
Soja		45,3 (80)	148,7 (35)
Żyto		58,9 (74)	141,6 (38)

* – za 100% aktywności przyjęto wartość uzyskaną w teście 1.

Tab e l a V. Wpływ ekstraktu z nasion na aktywność karboksypeptydazy A (CPA) oceniany za pomocą Bz-Gly-L-Phe i na aktywność karboksypeptydazy B (CPB) oceniany za pomocą Bz-Gly-L-Arg, w pH 7,5

Tab l e V. Effect of seeds extract on the activity of carboxypeptidase A (CPA) assessed using Bz-Gly-L-Phe and the activity of carboxypeptidase B (CPB), assessed using Bz-Gly-L-Arg in pH 7.5

Nasiona	CPA	CPB
	Phe	Arg
	nmol/cm ³ /30 min (%hamowania)*	
Bób	338,6 (0)	296,4 (0)
Dynia	328,0 (0)	304,0 (0)
Fasola	320,6 (2)	262,4 (5)
Gorczyca	338,0 (0)	298,6 (0)
Groch	320,7 (2)	260,0 (6)
Gryka	348,6 (0)	286,4 (0)

Tabela V. (cd.).

Table V (count.).

Nasiona	CPA	CPB
	Phe	Arg
	nmol/cm ³ /30 min (%hamowania)*	
Jęczmień	319,2 (3)	256,4 (7)
Kukurydza	321,5 (2)	268,6 (3)
Mak	356,0 (0)	278,0 (0)
Owies	310,3 (5)	248,8 (10)
Proso	338,0 (0)	270,2 (2)
Pszenica	310,6 (5)	262,4 (5)
Ślonecznik	348,9 (0)	284,0 (0)
Soczewica	328,9 (0)	262,4 (5)
Soja	308,6 (6)	268,5 (3)
Żyto	318,6 (3)	267,0 (3)

* – w teście kontrolnym (0,15 mol/dm³ NaCl, pH 7,5) ilość uwolnionej Phe przez CPA wynosiła 328,4 nmol/cm³/30min, a ilość uwolnionej Arg przez CPB wynosiła 276,0 nmol/cm³ /30 min.

WNIOSKI

1. W nasionach roślin spożywanych przez człowieka występują inhibitory dokonywanej przez trypsynę aktywacji prokarboksypeptydazy A i prokarboksypeptydazy B.
2. Inhibitory te mogą upośledzać trawienie peptydów i białek w jelicie cienkim.

M. Siergiejuk, A. Bańkowska-Łuksza, A. Worowska, M. Gacko

EFFECT OF PEPTIDASE INHIBITORS OF PLANT SEEDS EATEN BY HUMAN PROCARBOXYPEPTIDASE ACTIVATION AND ACTIVITY OF PANCREATIC CARBOXYPEPTIDASE

Summary

Inhibitor of peptidases found in the extracts from the seeds of beans, pumpkin, beans, mustard, peas, buckwheat, barley, maize, poppy, oats, millet, wheat, sunflower, lentils, soya and wheat carried by trypsin inhibit activation procarboxypeptidase A and B activation procarboxypeptidase. These inhibitors, however does not inhibit the activity of carboxypeptidase A and carboxypeptidase B activity in the operation of the specific substrates of peptidases.

PIŚMIENNICTWO

I. Konturek S.: Fizjologia czynności zewnątrzwydzielniczej i wewnątrzwydzielniczej trzustki. W: Choroby trzustki, red. *J. Dzieniszewski, A. Gabryelewicz*. PZWL, Warszawa, 1991; 27-78. – 2. *Auld D.S.*:

- Carboxypeptidase A. In handbook of proteolytic enzymes. eds. *Barrett A.J., Rawlings N.D., Woessner J.F.*, Acad Press, New York, 1998; 1321-1326. – 3. *Aviles F.X., Vendrell J.*: Carboxypeptidase B. In handbook of proteolytic enzymes, eds. *Barrett A.J., Rawlings N.D., Woessner J.F.* Acad Press, New York, 1998; 1333-1335. – 4. *Chlabicz M., Gacko M., Guzowski A., Krupkowska A., Bańkowska A.*: Termostabilność roślinnych inhibitorów proteaz przewodu pokarmowego. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 2005; 37 (supl.): 337-339. – 5. *Antao C.M., Malcata F.X.*: Plant serine proteases: biochemical, physiological and molecular features. *Plant Physiol. Biochem.*, 2005; 43: 637-650. – 6. *Bruzgo M., Gacko M., Guzowski A., Chlabicz M., Bańkowska A.*: Wpływ inhibitorów z nasion roślin spożywanych przez człowieka na aktywność preparatów stosowanych w substytucyjnym leczeniu niewydolności wewnątrzwydzielniczej trzustki. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 2005; 37 (supl.): 345-347. – 7. *Jasielczuk J., Gacko M., Guzowski A., Karwowska A., Chojnacka-Zdrodowska A.*: Wpływ inhibitorów z nasion roślin spożywanych przez człowieka na aktywność proteolityczną preparatu Citropepsin. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 2005; 37 (supl.): 353-355. – 8. *Karwowska A., Gacko M., Worowska A.*: Hamowanie aktywności pepsyny i aktywności katepsyny D przez ekstrakty z nasion roślin spożywanych przez człowieka. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 2008; 41(3): 258-261. – 9. *Pattern J.R., Richards E.A., Pope H.*: The effects of raw soybean on the pancreas of adult dogs. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1971; 137: 59-63. – 10. *Worowski K., Gabryelewicz A., Roszkowska W., Bajko K.*: The action of potato inhibitors on activation of zymogen forms of digestive system proteases. *Acta Hepatogastroenterol.*, 1979; 26: 413-416.
11. *Siergiejuk M., Worowska A., Karwowska A., Gacko M.*: Aktywność proteolityczna nasion roślin spożywanych przez człowieka. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 2010; 43(1): 15-19. – 12. *Bergmeyer H.U., Bergmeyer J., Grabl M.*: Methods in enzymatic analysis. Verlag Chemie, Weinheim, 1989; 5: 121-124. – 13. *Moore S.*: Amino acid analysis: aqueous dimethyl sulfoxide as solvent for the ninhydrin reaction. *J. Biol. Chem.*, 1968; 243: 6281-6283. – 14. *Folk J.E., Piez K.A., Carroll W.R., Gladner J.A.*: Carboxypeptidase B. IV. Purification and characterization of the porcine enzyme. *J. Biol. Chem.*, 1960; 235: 2272-2277. – 15. *Lu D., Sadler J.E.*: Enteropeptidase. In handbook of proteolytic enzymes. eds. *Barrett A.J., Rawlings N.D., Woessner J.F.* Acad Press, New York, 1998; 50-54. – 16. *Jacob R.T., Bhat P.G., Pattabiraman T.N.*: Isolation and characterization of a specific enterokinase inhibitor from kidney bean (*Phaseolus vulgaris*). *Biochem. J.*, 1983; 209(1): 91-97. – 17. *Siergiejuk M., Karwowska A., Gacko M., Worowska A.*: Wpływ inhibitorów z nasion roślin spożywanych przez człowieka na aktywność enteropeptydazy i aktywację trypsynogenu przez ten aktywator. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 2008; 40(3): 265-269. – 18. *Woodbury R.G., Everitt M.T., Neurath H.*: Mast cell proteases. *Meth. Enzymol.*, 1982; 80: 588-609. – 19. *Bańkowska A., Roszkowska-Jakimiec W., Worowski K.*: Inhibitor of pepsin, trypsin and chymotrypsin in seeds of plants consumed by human and animals. *Roczn. AM Białystok*, 1998; 43: 1-9. – 20. *Drzymala A., Prabucka B., Bielawski W.*: Mobilizacja białek zapasowych ziarniaków zbóż. *Post. Bioch.*, 2009; 55(4): 447-455.

Adres: 15-276 Białystok, ul. M. Skłodowskiej-Curie 24 A