

57
A-26

АКАДЕМИЯ НАУК ЛАТВИЙСКОЙ ССР
ОТДЕЛЕНИЕ ХИМИЧЕСКИХ И БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК

На правах рукописи

КУШАК Р. И.

**РОЛЬ ЭПИТЕЛИЯ ТОНКОЙ
КИШКИ В ГИДРОЛИЗЕ
ПЕПТИДОВ**

093 БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

А в т о р е ф е р а т
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Рига — 1967

На правах рукописи

КУШАК Р. И.

РОЛЬ ЭПИТЕЛИЯ ТОНКОЙ
КИШКИ В ГИДРОЛИЗЕ
ПЕПТИДОВ

093 БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Работа выполнена в лаборатории физиологии питания Института физиологии им. И. П. Павлова АН СССР и в лаборатории биохимии и физиологии животных Института биологии АН Латвийской ССР.

Научный руководитель: чл.-корр. АН СССР, доктор мед. наук, профессор Уголев А. М.

Официальные оппоненты:

чл.-корр. АН СССР, академик Латв. ССР, доктор мед. наук, профессор Шмидт А. А.;

кандидат биол. наук, доцент Берман Ш. А.

Ведущее научно-исследовательское учреждение: Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова АН СССР.

Автореферат разослан: 19 декабря 1967 г.

Защита диссертации состоится: 25 января 1968 г. на заседании Объединенного Ученого совета по биологическим наукам при Отделении химических и биологических наук АН Латв. ССР.

Просим ознакомить специалистов с авторефератом и прислать отзывы в двух экземплярах с подписью, заверенной печатью учреждения, по адресу: г. Рига, ул. Тургенева, 19, Отделение химических и биологических наук АН Латв. ССР.

С диссертацией можно ознакомиться в Фундаментальной библиотеке АН Латв. ССР.

Ученый секретарь совета
канд. с.-х. наук М. П. ЗАРУБИНА.

М. Зарубина

57

А 26

СК

Работа выполнена в лаборатории физиологии питания Института физиологии им. И. П. Павлова АН СССР и в лаборатории биохимии и физиологии животных Института биологии АН Латвийской ССР.

Научный руководитель: чл.-корр. АН СССР, доктор мед. наук, профессор Уголев А. М.

Официальные оппоненты:

чл.-корр. АН СССР, академик АН Латв. ССР, доктор мед. наук, профессор Шмидт А. А.;

кандидат биол. наук, доцент Берман Ш. А.

Ведущее научно-исследовательское учреждение: Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова АН СССР.

Автореферат разослан: <—> _____ 1967 г.

Защита диссертации состоится: <—> _____ 1967 г. на заседании Объединенного Ученого совета по биологическим наукам при Отделении химических и биологических наук АН Латв. ССР.

Просим ознакомить специалистов с авторефератом и прислать отзывы в двух экземплярах с подписью, заверенной печатью учреждения, по адресу: г. Рига, ул. Тургенева, 19, Отделение химических и биологических наук АН Латв. ССР.

С диссертацией можно ознакомиться в Фундаментальной библиотеке АН Латв. ССР.

Ученый секретарь совета
канд. с.-х. наук М. П. ЗАРУБИНА.

996950

Центральная научная
БИБЛИОТЕКА
Академии наук Киргизской ССР

1967 — 1968

В настоящее время убедительно показано, что в тонкой кишке человека и высших животных происходит полное расщепление белков (Van Slyke a. Meyer, 1912, Паршин и Рубель, 1951; Yuille et al., 1952; Stein a. Moore, 1954, Dawson a. Porter, 1962 и мн. др.) и пептидов (Newey a. Smyth, 1957; 1959; Johnston a. Wiggans, 1958; Wiggans a. Johnston, 1958; 1959 и др.) до аминокислот, однако относительно локализации заключительных стадий этого процесса существуют серьезные разногласия.

Длительное время считалось установленным, что переваривание белков, как и других пищевых веществ, осуществляется целиком в полости желудочно-кишечного тракта ферментами, секретлируемыми пищеварительными железами (Бабкин, 1927; 1960; Коштоянц, 1950; Buddenbrock, 1956 и др.).

Однако, уже Лондон (1916), а позднее и другие исследователи (Sajori, 1933; Fisher, 1954; Borgström et al., 1957) отмечали низкую активность кишечного сока, не соответствующую высоким скоростям гидролиза белков в кишечнике. О недостаточности полостного пищеварения свидетельствует также значительная разница в эффективности переваривания белка in vivo и in vitro под действием тех же пищеварительных энзимов (Frankel, 1916; Dunn a. Lewis, 1921; Borgström et al., 1957; Dawson a. Holdworth, 1962), и целый ряд других экспериментальных и клинических данных (Уголев, 1963; 1967).

Для объяснения возникших противоречий некоторые авторы (Sajori, 1933; Newey a. Smyth, 1960; Smyth, 1961) выдвинули гипотезу об участии эпителиальных клеток тонкой кишки в процессе пищеварения. По их мнению, пептиды диффундируют через клеточную мембрану в цитоплазму, где происходит их расщепление до мономеров.

Между тем имеется целый ряд фактов, противоречащих высказанной точке зрения. В частности, внутриклеточное пищеварение предусматривает пассивный транспорт олигомеров через клеточную мембрану, тогда как в кишечнике функционирует механизм активного транспорта, обеспечивающий высокие скорости поступления мономеров внутрь клеток (обзоры:

Файтельберг, 1960; Spencer, 1960; Wilson, 1962; Шишова-Касаточкина, 1964; Wiseman, 1964; Meister, 1965; Matthews a. Laster, 1965 и др.). Внутриклеточное пищеварение маловероятно и по той причине, что размеры пор клеточной мембраны являются ограничивающими для олигомеров с молекулярным радиусом больше 4А (Lindeman a. Solomon, 1962).

В 1959—1960 гг. А. М. Уголевым было показано, что промежуточные и заключительные стадии гидролиза различных пищевых веществ могут осуществляться с помощью ранее неизвестного механизма, локализованного на наружной поверхности мембран кишечных клеток. Пристеночное (контактное, мембранное) пищеварение, структурной основой которого является щеточная кайма эпителия тонкой кишки, представляет собой комплекс гидролитических процессов, происходящих как за счет сорбированных из химуса, так и собственно кишечных ферментов. С помощью различных методических приемов А. М. Уголев и сотрудники установили, что пристеночное пищеварение принимает активное участие в гидролизе белков денатурированной кровяной сыворотки (Уголев и др., 1961) и некоторых дипептидов (Уголев и др., 1964; Тимофеева, 1964, 1965).

Следовательно, данные, полученные главным образом в течение последних десяти лет, свидетельствуют о том, что заключительные стадии гидролиза белков осуществляются не в полости кишки, а с помощью ферментов, связанных со структурами клеток кишечного эпителия. Однако, остается неясным—происходит ли процесс интрацеллюлярно или на наружной поверхности цитомембран!

Попытка выяснить этот вопрос, весьма важный для понимания механизма гидролиза и всасывания протеина, была предпринята в настоящем исследовании. Решение его в первую очередь связано с отысканием новых методических приемов, которые бы давали большие возможности, чем применявшиеся ранее.

Не менее важным представлялось определить, в какой степени сходными или различными являются заключительные стадии гидролиза белков у животных разных видов и у животных определенного вида на разных этапах онтогенетического развития.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучение роли эпителия тонкой кишки в гидролизе пептидов проводилось в опытах с изолированными из организма

вывернутыми кишечными отрезками. Эксперименты такого рода хотя и не воспроизводят полностью процессы, происходящие *in vivo*, однако, очень удобны для аналитического изучения ряда функций кишечного эпителия. Они давали возможность разобщить гидролиз и активный транспорт, изменять условия контакта субстрата с поверхностью кишки, готовить различные модельные препараты и т. д.

Выключение активного транспорта и других энергетических процессов достигалось обработкой кишки ацетопом, который хотя и вызывает некоторые морфологические изменения в тканях, но не оказывает заметного действия на ферментативную активность (Пирс, 1962), или с помощью фтористого натрия. После применения указанных ингибиторов распределение продуктов реакции между тканью и окружающей средой определяется главным образом физическими законами.

Дифференциация процессов, происходящих по обе стороны клеточной мембраны, осуществлялась благодаря использованию ряда методических приемов, общих для большей части опытов. Они включали в себя: приготовление препаратов изолированных отрезков кишки, инкубацию их в растворах соответствующих субстратов и последующее определение начальных и конечных продуктов реакции, которое в некоторых сериях опытов производилось в основном во внутриклеточной жидкости, в некоторых — во внеклеточной, а во многих случаях — одновременно в интра- и экстрацеллюлярных жидкостях.

Количественное определение аминокислот и пептидов в образцах исследуемого материала осуществлялось с помощью методики тонкослойной хроматографии, несколько измененной и адаптированной в зависимости от задач эксперимента и имеющихся возможностей. Количественная оценка хроматограмм, регистрируемых фотографически путем контактного печатания, производилась на основе денситометрических кривых (микроденситометр фирмы «Joussé, Loebl and Co., LTD»). Последние в дальнейшем обрабатывались с помощью планиметра. Содержание вещества в пробах выражалось в относительных

единицах $\frac{N}{N_0}$ тах, где N — содержание аминокислот в данной пробе, N_0 тах — в пробе, полученной в стационарную фазу данного эксперимента, принятое за 1. Пептидазная активность (в % гидролизованного субстрата) определялась также фотометрически по приросту глицина при гидролизе глицинсодержащих пептидов (метод Alexander et al., 1945 в модификации А. М. Уголева и Н. М. Тимофеевой).

Экспериментальные данные были обработаны статистически по методу Стьюдента и Фишера; вычислялась средняя арифметическая величина, стандартная ошибка и показатель достоверности. В некоторых случаях использовался разностный метод.

В работу включены результаты острых опытов, выполненных на 129 животных разных видов. Как правило, в каждом эксперименте проводилось около 10 опытных и контрольных определений.

В первой части исследования локализация пептидазной активности определялась с помощью различных методических приемов в опытах на 41 животном (взрослые белые крысы линии Вистар). Во второй части экспериментальной работы для изучения механизма гидролиза пептидов в сравнительно-физиологическом и онтогенетическом аспектах было использовано 20 крысят (10, 20 и 30-дневного возраста), 49 цыплят породы белый леггорн в возрасте от 1 до 32 дней и 19 карпов (*Surgio carpio*) сеголеток, двухлеток и трехлеток.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Дифференциация внутриклеточного и внеклеточного гидролиза пептидов

Пептидазная активность у млекопитающих связана почти полностью со структурами кишечных клеток, поэтому дифференциация внутри- и внеклеточного пищеварения практически сводится к разделению процессов, происходящих интрацеллюлярно или на наружной поверхности мембран кишечного эпителия.

Исследование локализации пептидазной активности производилось с помощью различных методических приемов и в первую очередь для этой цели был использован конвекционный критерий (Уголев, 1964). Он базируется на известном положении о том, что скорость гетерогенной реакции, протекающей на поверхности, лимитируется в основном скоростью переноса вещества из глубины фазы. Увеличение его с помощью перемешивания будет сопровождаться значительным возрастанием скорости ферментативной реакции. В случае внутриклеточного пищеварения конвекция жидкости относительно поверхности кишки не должна оказывать заметного эффекта на интенсивность гидролиза.

В опытах с вывернутыми ацетонированными кусочками

тонкой кишки белых крыс было обнаружено, что при перемешивании гидролиз глицил-l-лейцина происходил примерно в 2 раза быстрее, чем без перемешивания. Скорость переваривания глицил-глицил-l-лейцил-глицина и глицил-глицил-d-лейцина была значительно ниже, чем дипептида, но и в этом случае движение жидкости относительно поверхности кишки характеризовалось значительным увеличением интенсивности гидролиза.

Наблюдаемое ускорение каталитической реакции при перемешивании объясняется улучшением условий контакта субстрата с соответствующими ферментными системами, локализованными на поверхности клеточных мембран, и свидетельствует о пристеночном характере гидролиза исследуемых ди- и олигопептидов. Величина эффекта конвекции в каждом случае, по-видимому, определяется молекулярным составом пептида, последовательностью его гидролиза, активностью соответствующих пептидаз и т. д.

Для изучения механизма гидролиза пептидов, кроме опытов с перемешиванием, казалось необходимым использовать другие методические приемы, содержащие более четкие и бесспорные критерии для дифференциации процессов, происходящих по обе стороны клеточной мембраны.

С этой целью нами совместно с А. М. Уголевым был разработан новый методический прием, основанный на зависимости скорости всасывания аминокислот от их молекулярных размеров (диффузионный критерий). Если гидролиз дипептида, состоящего из разных по величине аминокислот, происходит интрацеллюлярно, а активный транспорт исключен соответствующими ингибиторами энергетического обмена, то следует ожидать, что внутри кишечных клеток мономеры образуются в эквивалентных количествах, но «мелкие» аминокислоты будут быстрее диффундировать наружу и внутриклеточная жидкость будет отличаться более высокой концентрацией «крупных» аминокислот. Для внеклеточного пищеварения характерно, что аминокислоты проникают через мембрану со скоростями, обратными их молекулярным объемам, и концентрация «мелких» аминокислот во внутриклеточной жидкости будет наоборот больше, чем «крупных». В этом случае соотношение аминокислот в кишечных клетках должно быть таким же, как при инкубации кишки в эквивалентной дипептиду смеси аминокислот.

Распределение аминокислот, характерное для обоих типов гидролиза предварительно моделировалось в специальных

опытах с двумя камерами, разделенными целлофановой мембраной. Экстракт слизистой крысы, находящийся в одном объеме с дипептидом (глицил-1-лейцин), использовался для имитации внеклеточного пищеварения, а отделенный от него мембраной представлял собой модель кишечной клетки для исследования интрацеллюлярного гидролиза. Оказалось, что в первом случае во внутриклеточной жидкости быстрее накапливался глицин, тогда как во втором — лейцин. Во внеклеточной жидкости соответственно соотношение аминокислот имело обратный характер.

В опытах с вывернутыми (обработанными NaF) кусочками тонкой кишки белых крыс, инкубируемыми в течение 1—10 минут в растворе глицил-1-лейцина, обнаружили, что глицин проникал во внутриклеточную жидкость значительно быстрее, чем лейцин. Эта закономерность особенно отчетливо была выражена на первой минуте инкубации (уровень глицина был в 2,9 раза выше, чем лейцина); более длительные сроки приводили к постепенному сближению кинетических кривых поступления аминокислот.

Преимущественное накопление во внутриклеточной жидкости глицина, чем лейцина в соответствии с теоретическими посылками возможно лишь в том случае, если гидролиз дипептида происходит до его проникновения через клеточную мембрану. Если бы гидролиз происходил интрацеллюлярно, то в клетках наблюдался бы избыток лейцина.

Для окончательного решения вопроса сопоставляли содержание аминокислот во внутриклеточной жидкости при гидролизе глицил-1-лейцина и инкубации отрезков кишки в эквивалентном растворе аминокислот. Оказалось, что в обоих случаях ход кривых был близок, что возможно лишь тогда, когда гидролиз предшествует всасыванию.

Аналогичные опыты были проведены и с другими дипептидами. При инкубации препаратов кишечника в растворе глицил-1-тирозина или эквивалентной смеси аминокислот глицин накапливался в интрацеллюлярной жидкости значительно быстрее, чем тирозин, что характерно для внеклеточного пищеварения. Гидролиз глицил-dl- α -аланина, как и следовало ожидать, сопровождался близкими скоростями проникновения через мембрану глицина и аланина (с некоторым преобладанием первого), мало отличающихся по молекулярным размерам.

Исследование локализации заключительных стадий гидролиза белков производилось также с помощью концентрационного критерия (Rothstein, 1954), сущность которого заключа-

ется в том, что преимущественное содержание продуктов реакции во внутри- или внеклеточной жидкости соответствует пространственному расположению ферментативной активности. Однако, этот тест, являющийся абсолютным для дифференциации процессов, происходящих внутри клетки и в инкубационной среде, может привести к ошибочным выводам, если гидролиз осуществляется на мембране. (Уголев, 1964). Поэтому мы воспользовались усовершенствованным концентрационным критерием, для которого необходимо определение содержания образующихся веществ в ткани и в окружающем растворе в непосредственной близости от клеточной поверхности (Уголев и др., 1967).

В опытах с кусочками тонкой кишки белых крыс, обработанных NaF, нами совместно с Н. Ф. Тимофеевой было установлено, что при гидролизе глицил-1-лейцина наиболее высокая концентрация глицина (колориметрическое определение) обнаруживалась в слое внеклеточной жидкости, соприкасающемся с поверхностью кишки (во всех экспериментах принималась за 100%). Содержание аминокислоты во внутриклеточной жидкости было в 2,5 раза ниже и составляло $39 \pm 11,3\%$ ($P < 0,0027$), а во втором и третьем слоях внеклеточного раствора соответственно $79 \pm 8,5\%$ ($P < 0,05$) и $50 \pm 5\%$ ($P < 0,0027$).

При наличии активного транспорта (инкубация без NaF) поступление глицина в кишечные клетки (при расчете в мг% за 1 мин.) происходило примерно в 2 раза быстрее, чем в его отсутствии. В то же время характер соотношения концентраций глицина во внутри- и внеклеточной жидкости мало изменялся (уровень в I слое — 100%, в ткани — $55 \pm 7,6\%$, во II слое — $86 \pm 5,6\%$, в III слое — $66 \pm 5,6\%$).

В соответствии с используемым критерием преимущественное содержание глицина на наружной поверхности кишечного эпителия свидетельствует скорее о пристеночном характере гидролиза дипептида, чем о внутриклеточном пищеварении. Тот факт, что расщепление глицил-1-лейцина предшествует его всасыванию подтверждается также сходством кривых распределения продуктов гидролиза во внутри- и внеклеточной жидкости при инкубации кишки в растворе дипептида и эквивалентной смеси аминокислот.

Хроматографический анализ показал, что распределение лейцина во всех исследуемых образцах аналогично глицину и не обнаружил даже следов дипептида в кишечных клетках.

При инкубации полосок кишки в растворе глицил-глицина (в присутствии ионов Co^{++} для активации дипептидазы и

NaF) было обнаружено, что содержание глицина во внутриклеточной жидкости в 1,3 раза выше, чем в первом слое внеклеточного раствора, контактирующего с поверхностью кишки ($134 \pm 19,5\%$ против 100% ; $p < 0,2$). В более удаленных слоях инкубационной среды уровень глицина был соответственно ниже ($67 \pm 7,28\%$ и $54 \pm 11,3\%$; $p < 0,0027$).

Иное распределение глицина наблюдалось при инкубации кишки в растворе этой аминокислоты эквивалентом исследуемому дипептиду. Оказалось, что уровень глицина во внутриклеточной жидкости был в 2 раза ниже, чем в окружающей среде ($51 \pm 4,5\%$ против 100% в первом слое; $p < 0,0027$). Сравнимая абсолютное содержание глицина в кишечной ткани при инкубации кишки в растворах дипептида и глицина, было установлено примерно 6-кратное превышение уровня аминокислоты в последнем случае, что, вероятно, указывает на низкую глицил-глицин дипептидазную активность кишечника крысы (в опытах с глицил-1-лейцином эта разница составляла только 1,8).

Более высокое содержание глицина в клетках, чем на поверхности, а также различный характер его распределения при инкубации кишки в растворе дипептида и аминокислоты, свидетельствует о том, что расщепление глицил-глицина происходит преимущественно после его поступления через мембрану.

Аналогичный вывод был сделан нами на основании хроматографического исследования образцов внутри- и внеклеточной жидкости, однако, ни в одном из опытов не удалось обнаружить нерасщепленный дипептид в цитоплазме. Этот факт может свидетельствовать о тесной связи транспортных и гидролитических процессов в кишечных клетках. В то же время в инкубационном растворе наблюдалось постепенное, зависящее от близости к кишечной поверхности, уменьшение концентрации глицил-глицина.

Таким образом, данные, полученные с помощью различных методических приемов, приводят к однозначному ответу: на внешней поверхности клеточных мембран кишечного эпителия крыс существует механизм пристеночного пищеварения, обеспечивающий эффективный гидролиз ди- и олигопептидов. Только глицил-глицин, обладающий небольшими размерами молекул, способен проникать через поры клеточной мембраны и расщепляться внутриклеточно. Последний факт хорошо согласуется с недавними исследованиями Ноака (1966), который с помощью дифференциального центрифугирования обнару-

жил, что из всех исследованных пептидаз только глицил-глицин дипептидаза связана с фракцией микросом.

Сравнительно-физиологическое и онтогенетическое исследование локализации и развития пептидазной активности тонкой кишки

А. М. Уголевым и сотрудниками (Уголев и Саленце, 1964; Торопова, 1964; Иезуитова и др., 1964) было показано, что у млекопитающих в ранний постэмбриональный период, когда внутриклеточное пищеварение редуцировано, а полостное еще не функционирует в полной мере, переваривание углеводов осуществляется за счет пристеночного механизма. В то же время для того, чтобы сделать окончательный вывод о локализации пептидазной активности казалось недостаточным сведений, содержащихся в опытах с перемешиванием (Иезуитова и др., 1964). Были необходимы дополнительные данные, полученные в иных методических условиях. Для этой цели нами использовался специально разработанный диффузионный критерий.

В экспериментах с вывернутыми отрезками тонкой кишки белых крыс 10-, 20- и 30-дневного возраста, обработанных NaF для предотвращения активного транспорта и пиноцитоза, предварительно определяли кинетику пассивного транспорта аминокислот из смеси, эквивалентной исследуемому дипептиду. Хроматографический анализ показал, что скорости проникновения глицина и лейцина внутрь клеток были обратно пропорциональны их молекулярным объемам.

При инкубации кишки в растворе глицил-1-лейцина оказалось, что у крысят всех возрастных групп глицин накапливался во внутриклеточной жидкости значительно быстрее, чем лейцин. Соотношение между скоростями всасывания аминокислот не оставалось постоянным в течение эксперимента. Наиболее высоким оно было в 0,5 мин. пробе (больше 2) и уменьшалось с увеличением продолжительности инкубации.

Как уже указывалось, преимущественное поступление во внутриклеточную жидкость «мелких» аминокислот (глицина) возможно лишь в том случае, если расщепление дипептида происходит до его проникновения через клеточную мембрану (для внутриклеточного пищеварения было бы характерно более высокое содержание в клетках лейцина). В пользу этого предположения свидетельствует также близость кинетических кривых накопления аминокислот в опытах с глицил-1-лейци-

ном и со смесью мономеров и отсутствие интактного дипептида в кишечных клетках.

Дополнительные данные о локализации пептидазной активности были получены при исследовании образцов внеклеточной жидкости. Увеличенное содержание в ней лейцина, обладающего более низкой скоростью диффузии, чем глицина, служит убедительным подтверждением тому, что расщепление дипептида у крысят происходит на внешней поверхности цитомембран, а не внутриклеточно.

Значительный интерес представляло определение локализации заключительных стадий гидролиза белка у птиц в разные периоды онтогенетического развития.

При исследовании соотношение продуктов гидролиза глицил-1-лейцина в клетках эпителия тонкой кишки цыплят разного возраста было обнаружено, что у 6-, 16- и 28-дневных птиц глицин накапливался во внутриклеточной жидкости значительно быстрее, чем лейцин. Особенно четко эта разница была заметна после 0,5- и 1-минутной инкубации (составляла в среднем 2,4 и 1,8); по мере приближения к стационарному состоянию наблюдалось сближение кривых накопления глицина и лейцина.

В предварительных экспериментах с аминокислотными смесями, эквивалентными исследуемому дипептиду, хроматографический анализ показал, что независимо от возраста скорость всасывания (в условиях выключенного активного транспорта) определялась молекулярными размерами диффундирующих соединений. В этом случае преимущественное поступление внутрь кишечных клеток более мелких молекул глицина при гидролизе глицил-1-лейцина и наблюдаемое сходство кинетических кривых накопления глицина и лейцина при инкубации кишки в растворе дипептида и смеси аминокислот указывает на внеклеточную локализацию процесса гидролиза. В пользу этого предположения свидетельствует также отсутствие интактного дипептида в интрацеллюлярной жидкости.

Дифференциация внутри- и внеклеточного пищеварения у цыплят производилась также с помощью уже описанного конвекционного критерия.

В случае интрацеллюлярного пищеварения движение жидкости относительно поверхности кишки не должно влиять на скорость гидролиза, т. к. наиболее медленная стадия процесса — диффузия веществ через клеточные мембраны не зависит от эффекта конвекции. Это было показано в контрольных опытах с вывернутыми, обработанными NaF, кусочками тонкой

кишки цыплят 10-дневного возраста, инкубируемыми в растворе глицина. Колориметрический анализ внутриклеточной жидкости обнаружил, что прирост глицина при перемешивании и без перемешивания был примерно одинаков (соответственно $0,1 \pm 0,02$ и $0,08 \pm 0,002\%$ гидролизованного субстрата за 1 мин. на 1 см^2 поверхности слизистой; $p > 0,5$).

Иные данные были получены при инкубации препаратов кишечника в растворе глицил-1-лейцина. Перемешивание усиливало гидролиз дипептида в 1-дневном возрасте в 1,4 раза с $2,01 \pm 0,44$ до $2,9 \pm 0,45$ ($p < 0,01$), в 15—17-дневном — в 2,1 раза с $0,56 \pm 0,08$ до $1,2 \pm 0,17$ ($p < 0,01$) и в 30—32-дневном — в 2,3 раза с $0,42 \pm 0,08$ до $0,98 \pm 0,18$ ($p < 0,02$).

Наблюдаемое ускорение каталитической реакции при перемешивании свидетельствует о том, что гидролиз глицил-1-лейцина у цыплят в течение первого месяца жизни происходит главным образом на внешней поверхности клеточных мембран, а не интрацеллюлярно. Роль этого механизма значительно увеличивается между 1 и 15 днями постнатальной жизни и мало изменяется к 30-му дню.

Предметом специального изучения у цыплят был вопрос об изменении пептидазной активности различных отделов тонкой кишки с возрастом. Исследование показало, что наиболее высокая активность глицил-1-лейцин дипептидазы обнаруживается у птиц в 1-дневном возрасте, причем она концентрируется преимущественно в дистальной трети кишки ($3,89 \pm 0,61$ в % гидролизованного субстрата за 1 мин. на 1 см^2 поверхности слизистой); активности проксимального и среднего отделов ниже и близки между собой ($3,0 \pm 0,48$; $2,9 \pm 0,45$). Достоверная разница ($p < 0,02$) наблюдалась только между дистальной и средним отрезками.

К 15—17 дню происходило значительное (более чем в 2 раза) уменьшение ферментативной активности среднего и дистального отделов (до $1,2 \pm 0,17$ и $1,43 \pm 0,26$). Этот период характеризовался также отчетливо выраженным, достоверным максимумом пептидазной активности в проксимальном отделе ($2,36 \pm 0,32$), который сохранялся и в 30—32-дневном возрасте ($1,64 \pm 0,21$). Содержание фермента в средней и дистальной частях тонкой кишки в конце первого месяца жизни было одинаково ($0,98 \pm 0,18$; $0,97 \pm 0,16$) и в 1,6 раза ниже, чем в проксимальной.

Наблюдаемые изменения величины и распределения пептидазной активности, по-видимому, объясняются серьезной пе-

рестройкой пищеварительного аппарата птицы при переходе от питания *in ovo* к дефинитивному и являются адаптивными.

У рыб исследование локализации пептидазной активности производилось с помощью диффузионного и конвекционного критериев.

В экспериментах с вывернутыми кусочками тонкой кишки сеголеток и двухлеток карпа было установлено, что в условиях выключенного активного транспорта скорости всасывания глицина и лейцина из смеси аминокислот, эквивалентной исследуемому дипептиду обратно пропорциональны молекулярным объемам диффундирующих веществ.

Хроматографическое исследование образцов интрацеллюлярной жидкости после инкубации кишки в растворе глицил-*l*-лейцина показало, что независимо от возраста во все промежуточные времена наблюдалось преимущественное содержание в клетках глицина. Ход кинетических кривых накопления глицина и лейцина для дипептида и смеси аминокислот был аналогичен.

Полученные данные, характеризующиеся преимущественным поступлением глицина внутрь клеток и одинаковым соотношением в них быстро и медленно диффундирующих аминокислот в случае дипептида и смеси свидетельствуют о том, что гидролиз глицил-*l*-лейцина у сеголеток и двухлеток карпа предшествует его всасыванию. Для внутриклеточного пищеварения было бы характерно более высокое содержание в цитоплазме лейцина, чем глицина.

В опытах с вывернутыми кусочками тонкой кишки трехлеток карпа, обработанными NaF, было обнаружено, что перемешивание увеличивало прирост глицина (колориметрическое определение) в инкубационном растворе в 2,4 раза по сравнению с пробами, находившимися в покое (с $0,08 \pm 0,03$ до $0,19 \pm 0,02$ в % гидролизованного субстрата за 1 мин. на см^2 поверхности слизистой; $p < 0,02$).

Эффект конвекции, как известно, характерен только для внеклеточных процессов, поэтому есть все основания полагать, что и у 3-летних рыб гидролиз дипептида происходит наружу от мембраны, а не интрацеллюлярно.

У трехлеток карпа исследовалось также распределение глицил-*l*-лейцин дипептидазной активности вдоль тонкой кишки.

Оказалось, что ферментативная активность проксимального отрезка была несколько выше ($0,41 \pm 0,04$), чем среднего ($0,32 \pm 0,05$) или дистального ($0,33 \pm 0,05$), которые почти рав-

ны между собой, однако, достоверных различий, позволяющих говорить о существовании проксимо-дистального градиента пептидазной активности, не обнаружено.

Таким образом, представленные в этом разделе данные свидетельствуют о том, что у некоторых млекопитающих, птиц и рыб во все исследованные периоды онтогенетического развития заключительные стадии гидролиза белков (на примере глицил-*l*-лейцина) осуществляются преимущественно, если не целиком, наружу от клеточной мембраны, а не интрацеллюлярно.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Суммируя полученные нами данные и исследования других авторов, можно считать, что у млекопитающих механизм притечного пищеварения играет важную роль в переваривании белка.

Результаты опытов с олигопептидами свидетельствуют о том, что в зоне щеточной каймы осуществляются не только заключительные (Уголев и др., 1964; Тимофеева, 1965), но и промежуточные этапы гидролиза белковых молекул.

Разработка и применение диффузионного критерия дали возможность производить дифференциацию внутри- и внеклеточного пищеварения дипептидов в более жестких условиях, предусматривающих обе альтернативы. Эти эксперименты базируются не только на модельных опытах с целлофановыми мембранами и со смесями аминокислот, эквивалентными изучаемым дипептидам, но и подтверждаются данными ряда авторов, показавших зависимость скорости всасывания аминокислот от молекулярных размеров проникающих соединений (Wilson a. Lewis, 1929; Chase a. Lewis 1933, 1934; Bolton a. Wright, 1937; Kratzer, 1944). Исследование кинетических кривых накопления аминокислот во внутриклеточной жидкости показало, что гидролиз ряда дипептидов (глицил-*l*-лейцин, глицил-*l*-тирозин, глицил-*dl*- α -аланин) предшествует их всасыванию. Аналогичный вывод в отношении глицил-*l*-лейцина был сделан и при использовании концентрационного критерия.

Полученные в этих опытах данные хорошо согласуются с независимо от нас проведенными исследованиями Джозефсона и Съестрема (Josefsson a. Sjöström, 1966), которые, определяя освобождение и субклеточное распределение ряда кишечных дипептидаз, обнаружили факты, отрицающие возможность внутриклеточного гидролиза.

... Значительный интерес для проблемы локализации заключительных стадий переваривания белка представляют гистохимические данные, свидетельствующие о наличии в зоне щеточной каймы аминокептидазной (Burstone a. Wnisburger, 1961) и лейцинаминопептидазной активностей (Nachlas et al., 1960; Holt a. Miller, 1962), участвующих в ферментативном расщеплении пептидов.

Итак, на основании приведенных данных можно представить, что ди- и олигопептиды, попадая в поры щеточной каймы, расщепляются там под действием собственно кишечных ферментов, расположенных на поверхности клеточных мембран, возможно, в виде своеобразного конвейера (Уголев, 1963). Мономеры, образующиеся в непосредственной близости от поверхности, связываются с системами активного транспорта и переносятся внутрь клетки.

Результаты исследования находятся в соответствии с данными, свидетельствующими о непроницаемости кишечных мембран для ряда молекул водорастворимых веществ (Lindeman a. Solomon, 1962; Fordtran et al., 1965). Наблюдавшийся в наших опытах внутриклеточный гидролиз глицил-глицина, вероятно, обусловлен небольшими молекулярными размерами дипептида, позволяющими ему проникать во внутриклеточную жидкость. Это предположение подтверждается также исследованиями ряда авторов (Agar et al., 1953; Wiggins a. Johnston, 1958 и 1959 и др.), отмечавших наличие нерасщепленного глицил-глицина в серозной жидкости при инкубации вывернутых мешочков тонкой кишки в растворе дипептида.

Пристеночное пищеварение функционирует не только у взрослых животных. С его помощью, как это было показано в опытах на крысах, осуществляется переработка белка у млекопитающих на ранних стадиях онтогенеза.

Внеклеточный характер гидролиза глицил-*l*-лейцина характерен и для цыплят в различные периоды постнатальной жизни. Эти данные интересно сопоставить с исследованиями А. М. Уголева (1960), В. В. Ли (1962), Ш. А. Берман (1965), отмечавших роль кишечной поверхности в гидролизе крахмала и сахарозы у различных птиц. Раннее развитие и изменение градиента пептидазной активности у цыплят не являются удивительным, так как активности других собственно кишечных ферментов (щелочная фосфатаза, инвертаза), наблюдаются у них уже в эмбриональный период (Moog, 1950; Brown a. Moog, 1967).

У карпов независимо от возраста гидролиз глицил-*l*-лей-

цина предшествует его транспорту через клеточную мембрану, что находится в соответствии с данными Шлотке (Schlottke, 1939), отмечавшего основную массу дипептидазной активности в слизистой, однако противоречит его выводу о внутриклеточном расположении пептидаз.

Следовательно, внеклеточная локализация заключительных стадий гидролиза белка характерна животным, относящимся к различным филогенетическим группам, а возможно и всем позвоночным. Тот факт, что при расщеплении пептидов пищеварение предшествует всасыванию, имеет большое биологическое значение; благодаря этому осуществляется эффективное сопряжение процессов гидролиза и активного транспорта, обеспечивающее быструю абсорбцию образующихся мономеров.

В последние годы появились сообщения о том, что при некоторых заболеваниях (целиакии) наблюдается отсутствие в кишечнике определенных пептидаз, вследствие чего полностью гидролизованные полипептиды клейковины проходят через мембрану кишечных клеток и оказывают токсическое или антигенное действие на организм (Frazer, 1962; Herkovic et al., 1963 и др.). Для терапии подобных заболеваний, а также для решения некоторых вопросов, связанных с белковым питанием, значительный интерес представляют данные о локализации пептидазных активностей.

ВЫВОДЫ

1. В острых опытах на изолированных из организма вывернутых отрезках тонкой кишки некоторых представителей классов млекопитающих (крысы), птиц (цыплята), рыб (карпы) изучалась локализация гидролиза ди- и олигопептидов в эпителиальных клетках ворсинок. Этот же вопрос исследовался у упомянутых животных и в возрастном аспекте.

2. Для выяснения внутриклеточной или мембранной локализации пептидаз были использованы следующие экспериментальные критерии: а) конвекционный; б) усовершенствованный концентрационный критерий; в) специально разработанный для этой цели методический подход, основанный на зависимости скорости диффузии аминокислот от их молекулярных объемов (диффузионный критерий).

3. Движение жидкости относительно поверхности кишки существенно усиливает гидролиз глицил-*l*-лейцина, глицил-глицил-*l*-лейцил-глицина и глицил-глицил-*d*-лейцина у крыс,

что свидетельствует о внеклеточной (мембранной) локализации ферментов, расщепляющих упомянутые субстраты.

4. Изучение кинетики накопления продуктов гидролиза глицил-*l*-лейцина в модельных экспериментах на целофановых мембранах показало: а) если гидролиз дипептида предшествует его транспорту через мембрану, то в «интрацеллюлярной» жидкости быстрее накапливаются «мелкие» аминокислоты (глицин); б) если гидролиз следует за переносом через мембрану, то в растворе аккумулируются «крупные» молекулы аминокислот (лейцин).

Эти данные, а также исследования ряда авторов по определению скорости транспорта различных аминокислот и контрольные эксперименты, проведенные нами в каждой серии опытов, позволили произвести дифференциацию процессов гидролиза, происходящих в интра- и экстрацеллюлярной жидкости.

5. При инкубации препаратов тонкой кишки крыс в растворах глицил-*l*-лейцина, глицил-*l*-тирозина и глицил-*dl*- α -аланина установлено (методом тонкослойной хроматографии с последующей микроденситометрией), что мелкие аминокислоты накапливаются в интрацеллюлярной жидкости значительно быстрее, чем крупные. Кинетические кривые накопления аминокислот во внутриклеточной жидкости при инкубации кишки в растворах дипептидов и эквивалентных смесей аминокислот имеют сходный характер, что возможно лишь в том случае, если гидролиз предшествует транспорту пептидов через клеточную мембрану.

6. В экспериментах по исследованию микрофотографии распределения продуктов гидролиза глицил-*l*-лейцина во внутриклеточной жидкости и слоях внеклеточного раствора с помощью усовершенствованного концентрационного критерия обнаружено наиболее высокое содержание аминокислот в непосредственной близости от наружной поверхности клеточных мембран. Это указывает на мембранную, а не внутриклеточную локализацию соответствующей пептидазы в тонкой кишке крыс.

В то же время гидролиз глицил-глицина сопровождается преимущественным накоплением в клетках кишечного эпителия глицина, свидетельствуя тем самым об интрацеллюлярном расщеплении этого пептида.

7. Совокупность представленных данных, полученных с помощью независимых экспериментальных критериев, позволяет сделать вывод о том, что гидролиз исследованных пептидов

(за исключением глицил-глицина) осуществляется на внешней поверхности цитомембран и, таким образом, гидролитические процессы у взрослых крыс предшествуют активному транспорту образующихся мономеров.

8. В опытах на 10-, 20- и 30-дневных крысятах анализ кинетики накопления аминокислот, освобождающихся при гидролизе глицил-*l*-лейцина, обнаружил закономерности сходные с описанными выше у взрослых крыс. Таким образом, гидролиз дипептидов осуществляется экстрацеллюлярно не только у взрослых животных, но и у животных, находящихся на ранних стадиях постнатального развития.

9. Исследование локализации механизма гидролиза глицил-*l*-лейцина у птиц (цыплята породы белый леггорн) и рыб (сеголетки, двухлетки и трехлетки карпа) с помощью диффузионного и конвекционного критериев позволяет заключить, что независимо от возраста гидролиз дипептида у них, также как у млекопитающих, осуществляется экстрацеллюлярно.

10. Показано существование проксимо-дистального градиента глицил-*l*-лейцин дипептидазной активности у цыплят, который изменяется в зависимости от возраста.

11. Сопоставление результатов, полученных нами, с данными других исследователей позволило прийти к выводу, что получившая широкое распространение схема взаимоотношения гидролитических и транспортных процессов в тонкой кишке: частичное расщепление в полости — поступление продуктов в клетки слизистой — внутриклеточное пищеварение — окончательное всасывание представляется недостаточно обоснованной. Более вероятной является последовательность: полостной гидролиз — пристеночный гидролиз — всасывание.

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

1. Кушак Р. И. — Анализ локализации переваривания олигопептидов методом тонкослойной хроматографии. Матер. второй биохим. конфер. Прибалт. республик и БССР, стр. 253—255, Рига, 1965.
2. Кушак Р. И., А. М. Уголев — К локализации пептидазной активности в клетках тонкой кишки белых крыс. Докл. Акад. наук СССР, т. 168, № 2, стр. 477—479, 1966.
3. Ugolev A. M., R. I. Kooshuck. — Hydrolysis of dipeptides in cells of the small intestine. *Nature*, vol. 212, pp. 859—860, 1966.
4. Тимофеева Н. М., Р. И. Кушак — Механизм гидролиза дипептидов кишечными клетками. Матер. 16 научной сессии Института питания АМН СССР, в. 1, стр. 150—151, М., 1966.
5. Кушак Р. И. — Анализ переваривания некоторых дипептидов в тонкой кишке методом тонкослойной хроматографии. Матер. 16 научной сессии Института питания АМН СССР, в. 1, стр. 159—160, М., 1966.
6. Кушак Р. И., А. Я. Озод, А. Г. Буяке — Развитие ферментативной активности тонкой кишки цыплят. Тезисы докл. IX конфер. по физиологии пищеварения, ч. 1, стр. 172—173, Одесса, 1967.

