

Член-корреспондент АН СССР А. М. УГОЛЕВ,
Л. Ф. СМЕРНОВА, Н. М. ТИМОФЕЕВА

СПОНТАННАЯ СОЛЮБИЛИЗАЦИЯ ДИПЕПТИДАЗ С ПОВЕРХНОСТИ ИНТАКТНОЙ КИШЕЧНОЙ СЛИЗИСТОЙ

В настоящее время существуют две основных гипотезы о локализации заключительных стадий гидролиза пищевых белков кишечными пептидазами⁽¹⁾. Согласно одной из них, первоначально предложенной Ньюи и Смитом⁽²⁾, небольшие пептиды способны проникать через мембрану микроворсинок энтероцитов и гидролизываться под действием ферментов, локализованных внутриклеточно. После обнаружения мембранного пищеварения^(3, 4) было выдвинуто предположение о локализации ферментов, осуществляющих заключительные стадии переваривания белков, на поверхности мембран микроворсинок кишечных клеток. Эта точка зрения подтверждена многочисленными исследованиями локализации гидролиза дипептидов, проведенными *in vitro* с использованием различных препаратов интактной слизистой тонкой кишки⁽⁵⁻⁹⁾. Однако изучение распределения дипептидаз между различными фракциями энтероцитов показало, что не более 10% активности этих ферментов связано с фракцией изолированной щеточной каймы, тогда как основная ее часть присутствует в цитозоле^(1, 10-12).

Выдвинута гипотеза⁽¹⁾, согласно которой различные компоненты щеточной каймы (в том числе и ферменты) могут быть неодинаково прочно связаны с ее структурами. В частности, некоторые ферменты — мембранные комплексы — сравнительно легко разрушаются при определенных условиях, вследствие чего ферменты переходят во фракцию цитозоля. Одним из оснований для возникновения этой гипотезы послужили исследования Джексона и Сьюстрема⁽¹³⁾, наблюдавших спонтанную солюбилизацию дипептидаз тонкой кишки свиней в экспериментах *in vitro*. Несколько позднее в нашей лаборатории было показано, что связи многих дипептидаз со структурами энтероцитов чувствительны к аноксии⁽¹⁴⁾. Сходные данные получены также Линдбергом (цитировано по⁽¹⁾, стр. 91).

Способность кишечных дипептидаз легко солюбилизироваться в условиях аноксии открывает новые возможности для дальнейшего анализа их субклеточной локализации. Действительно, дипептидазы, локализованные на внешней поверхности мембраны микроворсинок энтероцитов после разрушения фермент-мембранных связей при аноксии будут переходить в раствор. Напротив, внутриклеточные дипептидазы не могут переходить из слизистой в омывающий раствор в тех же условиях, так как клеточная мембрана непроницаема для крупных белковых молекул.

Для того чтобы количественно охарактеризовать распределение некоторых дипептидаз в тонкой кишке по отношению к мембране энтероцитов, мы исследовали временную динамику солюбилизации этих ферментов *in vitro* в условиях аноксии.

Опыты были поставлены на белых крысах линии Вистар (самцы), весом 180—200 г, содержавшихся на обычном пищевом рационе и предварительно голодавших в течение 18—20 час. Изолированные участки тонкой кишки длиной 5 см, вывернутые слизистой наружу, инкубировали при 37° последовательно в 4 объемах раствора Рингера, рН 7,4 (по 7 мл каждый), в течение 15 мин. при аноксии. По окончании инкубации определя-

Таблица 1

Распределение ферментативных активностей между инкубационными растворами и слизистой

Фермент	Число исследованных животных	Активность ферментов в инкубационных растворах					Остаточная активность ферментов в гомогенате слизистой после инкубации	Суммарная активность в растворах и гомогенате слизистой
		инкубация 0—15 мин.	инкубация 15—30 мин.	инкубация 30—45 мин.	инкубация 45—60 мин.	суммарная активность		
Инвертаза	6	0	0	0	0	0	1,23± ±0,10	1,23± ±0,10
Глицилглицин-дипептидаза	6	0,15± ±0,13	0	0	0	0,15± ±0,13	1,35± ±0,23	1,50± ±0,23
Глицил-L-лейцин-дипептидаза	6	2,87± ±0,70	0,90± ±0,31	2,20± ±1,20	3,13± ±1,67	9,10± ±3,0	12,80± ±1,20	21,90± ±4,0

Примечание. Активность ферментов в растворах и гомогенате слизистой выражена в микромолях продуктов реакции, образующихся в 1 мин., и стандартизирована по длине кишки.

ли активность ферментов в каждом из растворов, а также остаточную активность в гомогенате слизистой, снятой с данного участка кишки. Для дифференциации истинной солюбилизации ферментов, локализованных на поверхности мембраны энтероцитов, от перехода их в инкубационные растворы вследствие десквамации кишечного эпителия или разрушения микроворсинок мы исследовали распределение инвертазы (3.2.1.26) между растворами и слизистой. Инвертазу определяли в качестве фермент-маркера, прочно связанного с мембраной микроворсинок.

Была исследована способность к солюбилизации в условиях аноксии двух дипептидаз: глицил-L-лейциндипептидазы (3.4.3.2) и глицилглицин-дипептидазы (3.4.3.4). Активность исследуемых дипептидаз в растворах и гомогенате слизистой определяли по приросту свободного глицина (в микромолях), а инвертазы — по приросту редуцирующих сахаров (в микромолях) в 1 мин. в расчете на вес слизистой, снятой с проинкубированного участка кишки длиной 5 см (14).

Результаты и обсуждение. Полученные результаты суммированы в табл. 1 и на рис. 1. Как можно видеть, инвертаза, прочно связанная со структурами микроворсинок, в инкубационный раствор практически не переходит. Это означает, что при инкубации вывернутых отрезков тонкой кишки в условиях аноксии в течение 60 мин. не происходит разрушения структуры щеточной каймы или десквамации энтероцитов.

Лишь около 10% глицилглициндипептидазной активности можно обнаружить в инкубационном растворе, тогда как около 90% ее остается после окончания инкубации в гомогенате слизистой. Интересно, что вся десорбированная глицилглициндипептидаза присутствует в первом инкубате.

Иные результаты были получены при изучении распределения глицил-L-лейциндипептидазы между инкубационными растворами и слизистой. Было обнаружено, что в среднем до 40% общей активности этого фермента переходит в течение 1 часа в инкубационный раствор. Трудно интерпретировать временную динамику десорбции этого фермента. Действительно, после интенсивной десорбции в течение первых 15 мин. наблюдается резкое снижение выхода этого фермента в инкубационный раствор между 15-й и 30-й мин., а затем происходит новое достоверное увеличение.

Попытаемся проанализировать полученные результаты. Прежде всего обращает на себя внимание тот факт, что в условиях наших экспериментов не наблюдается перехода маркерного мембранного фермента в инку-

бационный раствор. В этих же условиях поведение двух пептидаз (которые на основании изучения ферментативной активности изолированной цеточной каймы были отнесены к интрацеллюлярным ферментам, растворенным в цитозоле) резко различается.

То обстоятельство, что глицилглициндипептидаза обнаруживается главным образом в слизистой, а не в инкубационном растворе, понятно, так как мембрана энтероцитов практически непроницаема для крупных водорастворимых молекул, молекулярный вес которых более нескольких сот

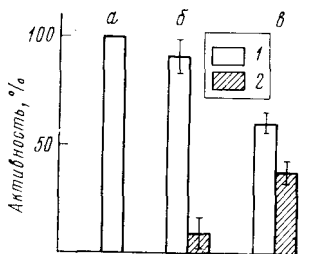


Рис. 1. Распределение активности инвертазы (а), глицилглициндипептидазы (б) и глицил-L-лейциндипептидазы (в) между инкубационным раствором и кишечной слизистой. 1 — остаточная активность ферментов в гомогенате слизистой, 2 — активность ферментов, перешедших в инкубационный раствор. За 100% принята суммарная активность раствора и гомогената слизистой

дальтон (15, 16). Напротив, около 40% глицил-L-лейциндипептидазы обнаруживается в инкубационных растворах, что свидетельствует об иной клеточной локализации этого фермента по сравнению с глицилглициндипептидазой. Если последняя находится главным образом внутри от диффузионного барьера, то не менее 40% глицил-L-лейциндипептидазы — снаружи от него. Таким образом, один из исследуемых ферментов, по-видимому, участвует главным образом во внутриклеточном, а другой — в мембранном гидролизе пептидов.

Непрочность фермент-мембранных связей создает дополнительные трудности для определения точной локализации многих важных функциональных структур клеточных мембран. Приведенные здесь данные демонстрируют возможность использования предлагаемого нами приема и анокисической «десорбции» кишечных пептидаз для дифференциации пространственного распределения этих ферментов и, возможно, других компонентов клетки по отношению к мембране микроворсинок. Кроме того, возникает вопрос, какое физиологическое значение могут иметь лабильные фермент-мембранные комплексы.

Институт физиологии им. И. П. Павлова
Академии наук СССР
Ленинград

Поступило
3 I 1975

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- 1 Peptide Transport in Bacteria and Mammalian Gut. A Ciba Found. Symp. (11 November, 1971), ASP, Amsterdam, 1972.
- 2 H. Newey, D. H. Smyth, J. Physiol., v. 145, 48 (1959).
- 3 А. М. Уголев, Бюлл. экспер. биол. и мед., т. 49, 12 (1960).
- 4 А. М. Уголев, Мембранное пищеварение. Полисубстратные процессы, организация и регуляция, «Наука», 1972.
- 5 А. М. Уголев и др., В кн.: Научн. конфер. по пробл. физиол. и патол. пищеварения и всасывания, Одесса, 1961, стр. 240.
- 6 А. М. Уголев et al., Nature, v. 202, 807 (1964).
- 7 А. М. Уголев и др., Die Nahrung, B. 11, 595 (1967).
- 8 Р. И. Кушак, А. М. Уголев, ДАН, т. 168, 477 (1966).
- 9 E. B. Fern et al., Biochem. J., v. 114, 855 (1969).
- 10 J. B. Rhodes et al., Biochem. et biophys. acta, v. 135, 959 (1967).
- 11 А. А. Груздков и др., В кн.: Физиология и патология тонкой кишки. Матер. Всесоюзн. конфер. гастроэнтерологов, Рига, 1970, стр. 53.
- 12 Y. S. Kim et al., J. Clin. Invest., v. 51, 1419 (1972).
- 13 L. Josefsson, H. Sjöström, Acta physiol. scand., v. 67, 27 (1966).
- 14 А. М. Уголев, Н. М. Тимофеева, В кн.: Исследование пищеварительного аппарата у человека, «Наука», 1969, стр. 178.
- 15 А. М. Уголев, P. De Laey, Biochim. et biophys. acta, v. 300, 105 (1973).
- 16 Intestinal Absorption. Biomembranes, v. 4A, London — N. Y., 1974.