

УДК 619:616.34-002:615.246:636.2.053

## МУЛЬТИСУБСТРАТНЫЕ ПРОЦЕССЫ ПРИ МЕМБРАННОМ ГИДРОЛИЗЕ НЕКОТОРЫХ НУТРИЕНТОВ У МЛЕКОПИТАЮЩИХ

\*Щербаков Г.Г., \*\*Напреенко А.В., \*\*Ковалёнок Ю.К.

\*Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация

\*\*УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск, Республика Беларусь

*Экспериментально показано, что максимально выраженный эффект на гидролиз субстратов оказывает модификатор и менее значительный – его дериваты. На примере влияния трибутирина на активность солюбилизованных щелочной фосфатазы и глицил-L-лейцилдипептидазы было показано, что модификаторный эффект идентичен таковому при воздействии на мембраносвязанные аналоги энзимов. **Ключевые слова:** мембранное пищеварение, гидролиз, крысы, субстраты, модификаторы.*

## MULTI-SUBSTRATE PROCESSES IN THE MEMBRANE HYDROLYSIS OF SOME NUTRIENTS IN MAMMALS

\*Shcherbakov G.G., \*\*Napreenka A.V., \*\*Kavalionak Y.K.

\*Saint Petersburg State Academy of Veterinary Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

\*\*Vitebsk State Academy of Veterinary Medicine, Vitebsk, Republic of Belarus

*It is shown experimentally that the maximum pronounced effect on the hydrolysis of substrates renders modifier and less significant - its derivatives. By the example of the effect of tributyrin on the activity of solubilized alkaline phosphatase and glycyL-L-leucine dipeptidase, it was shown that the modifier effect is identical to that when exposed to membrane-bound analogs of enzymes. **Keywords:** membrane digestion, hydrolysis, rats, substrates, modifiers.*

**Введение.** Одной из важнейших функциональных характеристик пищеварительного процесса является его полисубстратность [1, 3, 4, 8, 9, 10]. В современном понимании гидролиз мультикомпонентного корма не является суммой отдельных гидролитических и транспортных цепей. Рядом ученых сформировано значительное научное наследие в области изучения биологии полостного и мембранного пищеварения, существующих механизмов транспорта компонентов диеты из полости кишки во внутреннюю среду организма и т.д. Вместе с тем, до настоящего времени ученым сообществом не выработано единое представление о закономерностях расщепления нутриентов многокомпонентной диеты. Представленные в литературе взгляды как о том, что расщепление каждого пищеварительного субстрата происходит в своем собственном энзиматическом пространстве [5, 6, 7], так и о существовании сложных полисубстратных взаимоотношений [1, 2, 3, 4, 8, 9, 10] имеют как своих сторонников, так и оппонентов. В этой связи механизмы одновременного взаимодействия субстратов поликомпонентной диеты, происходящие в зоне щеточной каймы энтероцитов, представляются нам недостаточно изученными. Определение особенностей взаимодействия некоторых групп нутриентов на стадии мембранного гидролиза у млекопитающих явилось целью исследований.

**Материалы и методы исследований.** Исследования выполнены в институте физиологии им. М.П. Павлова Российской академии наук, Санкт-Петербургской (Россия) и Витебской (Беларусь) государственных академиях ветеринарной медицины.

Опыты проводились на белых крысах (n=7). Опыты выполнены в 3-кратной повторности.

Материалом для исследований являлись следующие биосубстраты: отрезки тонкой кишки, ее гомогенаты и солюбилизованные кишечные ферменты.

Из эксперимента все животные выводились путем цервикальной дислокации. Получаемые участки тонкой кишки от всех животных смешивались.

Сегменты тонкой кишки, взятые дистальнее связки Трейтца, быстро удалялись из организма, промывались холодным раствором Рингера (рН 7,4). Вывернутые (интактные) сегменты тонкой кишки в последующем подвергались инкубации с испытуемыми субстратами и модификаторами. Для получения гомогенатов слизистой оболочки участки кишечника длиной 30-50 мм суспендировали вместе в ледяном фосфатном буфере Рингера. Для подготовки солюбилизованных энзимов, соскобы участков слизистой оболочки кишки были гомогенизированы, при этом активные формы ферментов высвобождались в раствор под действием папаина в присутствии Цистеин-L гидрохлорида моногидрата или трипсинизацией в присутствии Triton® X-100 (производство AppliChem GmbH) по методикам (Auricchio, Dahlqvist&Semenza, 1963; Eggermont, 1968). Полученный супернатант демонстрировал 80-90% от исходной активности карбогидраз

(инвертазы КФ 3.2.1.26 и мальтазы КФ 3.2.1.20), дипептидазы (глицил-L-лейциндипептидаза КФ 3.4.3.2) и 40% и щелочной фосфатазы (КФ 3.1.3.1).

В качестве субстратов и модификаторов использовались растворы: глицил-L-лейцин (3 г/л), сахароза и мальтоза (20 г/л),  $\beta$ -глицерофосфат натрия (5 г/л) и трибутирин (2,5 г/л). Кроме того, в качестве модификаторов использовались бутирины (2 г/л) и эквивалентная глицил-L-лейцину смесь аминокислот (3 г/л).

Образцы кишки массой 700 мг инкубировали в 16 мл субстратных растворов при pH 7,4 и газировали  $O_2$ - $CO_2$  (95:5). Инкубационный период составлял 45 минут при 37<sup>0</sup>С при постоянном перемешивании (амплитуда 10 мм, скорость 60 об/мин.). Первый образец отбирали после инкубации в течение 5 минут, последующие - с интервалами в 10 минут.

Гомогенаты тканей инкубировали в течение 10-15 мин. при 37<sup>0</sup>С с 16 мл субстратных растворов.

Скорость гидролиза субстрата оценивалась по накоплению соответствующих продуктов. Гидролиз трибутирина – по приросту свободного глицерина (Уголев А.М. и Черняховская М.Ю., 1969), гидролиз  $\beta$ -глицерофосфата натрия - по приросту неорганического фосфора по методу Фиске и Субарроу (1925). Концентрация субстратов – модификаторов соответствовала концентрации основных субстратов.

Процедуры анализа осуществляли с помощью статистических пакетов SAS 9.2, STATISTICA 9 и SPSS-19.

**Результаты исследований.** Экспериментально установлено, что трибутирин значительно ингибирует активность щелочной фосфатазы на 80% ( $p < 0,01$ ), что превышает тормозящий эффект эквивалентной концентрации трибутирина на гидролиз глицил-L-лейцина, отмеченный нами ранее. Следует отметить, что максимум торможения (до 96%) активности щелочной фосфатазы наблюдается в первые 5 минут эксперимента (таблица 1).

**Таблица 1 - Влияние различных модификаторов на гидролиз  $\beta$ -глицерофосфата натрия интактными кусочками тонкой кишки белых крыс (M, m, p)**

| Время инкубации (мин.) | Ферментативная активность щелочной фосфатазы (в мкг образующегося неорганического фосфора) |                  |                   |                    |                   |                   |                   |
|------------------------|--|------------------|-------------------|--------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|                        | 1  | 2                | 3                 | 4                  | 5                 | 6                 | 7                 |
| 5                      | 15,10<br>±1,05   | 14,63<br>±0,853* | 13,71<br>±0,895** | 11,51<br>±0,918*** | 7,69<br>±0,554*** | 11,23<br>±0,966** | 13,41<br>±0,774** |
| 15                     | 46,8<br>±3,72  | 38,7<br>±2,69*   | 35,3<br>±1,45**   | 30,70<br>±2,148**  | 19,3<br>±1,68***  | 35,7<br>±2,12**   | 37,4<br>±2,28**   |
| 35                     | 77,8<br>±6,11  | 70,3<br>±6,12    | 69,3<br>±5,47**   | 58,2<br>±4,31**    | 43,2<br>±3,21***  | 55,9<br>±4,11*    | 61,6<br>±5,08*    |

Примечания: \*\*\* -  $p < 0,001$ , \*\* -  $p < 0,01$ , \* -  $p < 0,05$  при сравнении с гидролизом субстрата в отсутствие модификатора. 1 - гидролиз субстрата в отсутствие модификатора; 2 - гидролиз субстрата в присутствии масляной кислоты; 3 - гидролиз субстрата в присутствии монобутирина; 4 - гидролиз субстрата в присутствии дибутурина; 5 - гидролиз субстрата в присутствии трибутирина; 6 - гидролиз субстрата в присутствии глицил-L-лейцина; 7 - гидролиз субстрата в присутствии эквимольной смеси аминокислот.

Анализируя влияние дипептида и эквимольной смеси аминокислот, следует отметить, что совокупный ингибирующий эффект модификаторов на гидролиз липидов укладывается в 25-40% диапазон в течение всего периода инкубации (таблица 1).

При исследовании влияния глицил-L-лейцина на гидролиз трибутирина интактными кусочками тонкой кишки отмечалось значимое ( $p < 0,01$ ) повышение активности щелочной фосфатазы, что в пересчете на мкг освобожденного глицерина составило  $40,12 \pm 3,598$  (при сравнении с  $25,74 \pm 2,312$  мкг освобожденного глицерина, образующегося при гидролизе трибутирина без присутствия модификатора). Важно отметить, что полученные результаты иллюстрируют 50%-ный стимулирующий эффект субстрата-модификатора на гидролиз трибутирина, наблюдаемый в течение первых 20 минут инкубации. При продолжении инкубации отмеченное различие между моно- и бисубстратными процессами становится менее существенным.

С целью изучения организации полисубстратных процессов нами были проведены исследования гомогенатов слизистой оболочки тонкой кишки. При изучении влияния различных субстратов на активность щелочной фосфатазы и глицил-L-лейциндипептидазы гомогенатов тонкой кишки белых крыс было установлено, что наибольшее значимое торможение активности щелочной фосфатазы (около 70%,  $p < 0,01$ ) отмечалось в присутствии трибутирина, наименьшее – в присутствии оливкового масла (5-7%,  $p > 0,05$ ).

Ингибиторный эффект трибутирина, триолеина, лецитина и смеси пальмитинов на гидролиз глицил-L-лейцина варьировал в 18-79%-ном диапазоне ( $p < 0,01$ ). Максимальные значения относятся к влиянию лецитина на активность глицил-L-лейциндипептидазы.

Для детализации возможных механизмов взаимодействия субстратов-модификаторов с ферментами на уровне мембран энтероцитов мы провели серию модельных опытов по изучению активности некоторых солюбилизованных ферментов (щелочной фосфатазы, глицил-L-лейциндипептидазы, мальтазы и инвертазы).

Анализируя данные таблицы 2, следует отметить, что максимальное значимое ингибирование активности солюбилизованной глицил-L-лейциндипептидазы происходило в присутствии трибутирина (торможение гидролиза дипептида достигало 68% к 45 минуте инкубации,  $p < 0,001$ ). Продукты гидролиза модификатора к тому же самому сроку вызывали торможение гидролиза глицил-L-лейцина от 10 до 55% (таблица 2,  $p < 0,05$ ).

Трибутирин оказывает стимулирующее действие на активность солюбилизованных инвертазы и мальтазы (таблица 3). При этом следует отметить, что стимуляция гидролиза сахаразы происходила к концу инкубации, а мальтазы – начиная с первых минут эксперимента, достигая максимальных значений к 45 минуте (таблица 3).

**Таблица 2 - Влияние трибутирина и продуктов его гидролиза на активность солюбилизованной глицил-L-лейциндипептидазы тонкой кишки белых крыс (M, m, p)**

| Время инкубации (мин.) | Активность глицил-L-лейциндипептидазы (в % гидролизованного дипептида) |                                |                            |                          |                           |
|------------------------|--|--------------------------------|----------------------------|--------------------------|---------------------------|
|                        | Гидролиз дипептида в отсутствие модификатора                           | В присутствии масляной кислоты | В присутствии монобутирина | В присутствии дибутурина | В присутствии трибутирина |
| 5                      | 18,3±1,59  | 17,9±1,01                      | 17,1±1,21                  | 15,7±1,17                | 13,6±0,78*                |
| 25                     | 51,2±4,42  | 43,7±4,02                      | 49,3±4,13                  | 41,4±2,26**              | 34,8±1,93**               |
| 45                     | 69,8±5,03  | 64,1±5,61                      | 60,2±4,79                  | 57,6±2,11*               | 41,6±3,86***              |

Примечания: \*\*\* -  $p < 0,001$ , \*\* -  $p < 0,01$ , \* -  $p < 0,05$  при сравнении с гидролизом дипептида в отсутствие модификатора.

**Таблица 3 - Влияние трибутирина на активность солюбилизованных инвертазы и мальтазы тонкой кишки белых крыс (M, m, p)**

| Время инкубации (мин.) | Ферментативная активность дисахаридаз (в мкмоль образующихся продуктов гидролиза) |                                    |                   |                                    |
|------------------------|---|------------------------------------|-------------------|------------------------------------|
|                        | Гидролиз сахарозы   | Гидролиз в присутствии трибутирина | Гидролиз мальтозы | Гидролиз в присутствии трибутирина |
| 5                      | 12,5±1,09   | 5,61±0,529                         | 150,8±10,91       | 170,3±45,69                        |
| 25                     | 38,7±3,22   | 43,8±3,83                          | 198,5±13,81       | 228,7±20,51                        |
| 45                     | 71,5±5,01   | 92,1±6,72*                         | 257,9±18,64       | 310,4±27,81*                       |

Примечание.  $p < 0,05$  при сравнении с гидролизом дисахарида в отсутствие модификатора.

Нами было установлено, что в первые 5 минут инкубации ингибирующее влияние три-, ди- и монобутирина на активность солюбилизованной щелочной фосфатазы было равно 49, 30 и 24% соответственно (таблица 4). Следует отметить, что тормозящий эффект модификатора и продуктов его гидролиза увеличивался к концу инкубации, достигая максимальной отметки в отношении влияния трибутирина на активность исследуемого фермента (76%,  $p < 0,001$ ). К данному моменту исследования моно- дибутурином значимо ингибировали гидролиз  $\beta$ -глицерофосфата натрия более чем на 30% ( $p < 0,01$ ) (таблица 4). Масляная кислота незначимо ингибировала активность исследуемого фермента на протяжении всего периода инкубации (таблица 4).

**Таблица 4 - Влияние трибутирина и продуктов его гидролиза на активность солюбилизированной щелочной фосфатазы тонкой кишки белых крыс (M, m, p)**

| Время инкубации (мин.) | Активность щелочной фосфатазы (в мкг образующегося неорганического фосфора) |                                |                            |                          |                           |
|------------------------|---|--------------------------------|----------------------------|--------------------------|---------------------------|
|                        | Гидролиз субстрата в отсутствие модификатора                                | В присутствии масляной кислоты | В присутствии монобутирина | В присутствии дибутурина | В присутствии трибутирина |
| 5                      | 5,91±0,451  | 5,42±0,356                     | 4,75±0,378                 | 4,55±0,395               | 3,97±0,291**              |
| 25                     | 25,8±2,49   | 22,3±1,34                      | 19,81±0,698*               | 18,7±0,67*               | 16,4±1,09**               |
| 45                     | 46,4±3,35   | 39,7±2,77                      | 34,2±1,64**                | 31,6±1,21***             | 26,4±0,618***             |

Примечания: \*\*\* -  $p < 0,001$ , \*\* -  $p < 0,01$ , \* -  $p < 0,05$  при сравнении с гидролизом  $\beta$ -глицерофосфата натрия в отсутствие модификатора.

**Закключение.** Нами установлено, что модификаторы и субстраты взаимодействуют по принципу стимулирования/торможения гидролиза. Так, фосфорные эфиры ингибируют активность глицил-L-лейцилдипептидазы на 18% преимущественно к 45 мин. инкубации. Максимальный ингибирующий эффект на гидролиз исследуемых субстратов отмечен преимущественно у трибутирина (более 80%). Был отмечен схожий по характеру действия эффект трибутирина и в отношении солюбилизированной щелочной фосфатазы и глицил-L-лейцилдипептидазы. Различия состояли лишь в том, что действие модификатора на активность исследуемых энзимов было выше, чем на их связанные с мембраной энтероцита аналоги, в среднем на 72%, преимущественно к концу инкубации.

**Литература.** 1. Коваленок, Ю. К. Механизмы всасывания микроэлементов кишечником жвачных в условиях *in vitro* / Ю. К. Коваленок // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины. – Казань, 2012. – Т. 211. – С. 269–274. 2. Коваленок, Ю. К. Устройство для изучения всасываемости веществ кишечником животных / Ю. К. Коваленок // Международный вестник ветеринарии. – 2012. – № 1. – С. 16–20. 3. Коваленок, Ю. К. Активность мальтазы при кишечном дисбиозе животных / Ю. К. Коваленок, А. В. Напреенко // Ученые записки учреждения образования «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины»: научно-практический журнал. – Витебск, 2017. – Т. 53, вып. 2. – С. 56–59. 4. Метельский, С. Т. Два механизма мембранного пищеварения: ферментативно-транспортный ансамбль существует и для олигопептидов / С. Т. Метельский, В. Т. Ивашкин // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2011. – Т. 21, № 3. – С. 19–23. 5. Распределение инвертазной, пептидазной и моноглицеридлипазной активностей вдоль тонкой кишки у различных млекопитающих / А. М. Уголев [и др.] // Материалы IV конференции физиологов республик Средней Азии и Казахстана. – Алма-Ата, 1969. – Т. II. – С. 260–263. 6. Уголев, А. М. Определение протеолитической активности / А. М. Уголев, Н. М. Тимофеева // Исследование пищеварительного аппарата у человека: обзор современных методов / А. М. Уголев [и др.] – Ленинград: Наука, 1969. – С. 176. 7. Черняховская, М. Ю. Локализация заключительных стадий гидролиза трибутирина в эпителиальных клетках тонкой кишки / М. Ю. Черняховская, А. М. Уголев // Доклады АН СССР. – 1969. – Т. 187, № 3. – С. 701–703. 8. *Intestinal alkaline phosphatase regulates protective surface microclimate pH in rat duodenum* [Electronic resource] / M. Mizumori [et al.] // *J. Physiol.* – 2009. – Vol. 587, № 14. – P. 3651–3663. – Mode of access: <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.172270>. 9. *Iqbal, J. Intestinal lipid absorption* [Electronic resource] / J. Iqbal, M. M. Hussain // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* – 2009. – Vol. 296, № 6. – P. 1183–1194. – Mode of access: <https://doi.org/10.1152/ajpendo.90899.2008>. 10. *Role of phosphatidylcholine in brush-border intestinal alkaline phosphatase release and restoration* / T. Nakano [et al.] // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.* – 2009. – Vol. 297, № 1. – P. 207–214.

Поступила в редакцию 16.04.2020 г.