

А. Н. ПАРШИН и Л. Н. РУБЕЛЬ

ПРИРОДА ПРОДУКТОВ БЕЛКОВОГО ПЕРЕВАРИВАНИЯ, ВСАСЫВАЮЩИХСЯ ИЗ КИШЕЧНИКА В КРОВЬ

(Представлено академиком К. М. Быковым 11 I 1951)

К настоящему времени достигнуты значительные успехи в изучении белкового обмена. В то же время некоторые разделы химии и обмена белков до сих пор остаются спорной и мало разработанной областью. Сюда в первую очередь приходится отнести исследования о характере продуктов ферментативного гидролиза белков в желудочнокишечном тракте человека и животных, всасывающихся в кровяное русло. Решение этого вопроса имеет важное теоретическое и практическое значение. Выяснение начальных этапов обмена белков должно помочь в истолковании ряда патологических процессов, в суждении о функциональной способности отдельных органов, при применении искусственного парентерального белкового питания. И. П. Павлов ⁽¹⁾ еще более 40 лет тому назад интересовался природой продуктов белкового переваривания, которые попадают из кишечника в кровь. Тем не менее, единой точки зрения по данному вопросу не существует и в наши дни. Если раньше принималось, что всасывание белковых веществ из тонкого кишечника происходит в форме аминокислот, то в более позднее время рядом авторов как у нас ⁽²⁻⁶⁾, так и за рубежом ⁽⁷⁾ признается, что, помимо свободных аминокислот, всасываются и более сложные ингредиенты — полипептиды. Существует и такая точка зрения, согласно которой в кровь в процессе пищеварения поступают только крупные белковые компоненты ⁽⁸⁾. Критическое рассмотрение литературных данных убедило нас в том, что главной причиной, порождающей эти разногласия, является отсутствие надежных методов качественного и количественного определения полипептидов в биологических субстратах.

Все существующие способы определения полипептидов можно разделить на три группы. В основе первой группы, нашедшей наибольшее распространение, лежит определение аминокислотного азота до и после кислотного гидролиза в трихлоруксусных фильтратах крови ⁽⁹⁾. Вторая группа состоит в определении разницы в количестве остаточного азота в фильтратах крови при осаждении белковых трихлоруксусной и фосфорновольфрамовой кислотами ⁽¹⁰⁾ или по количеству тирозина ⁽¹¹⁾ в этих же фильтратах. К третьей группе относятся все способы титрования карбоксильных групп в растворах с различной концентрацией спирта ⁽¹²⁾. Надежность перечисленных методов определения полипептидов достаточно очевидна. В самом деле, определение полипептидов по увеличению аминокислотного азота в трихлоруксусных фильтратах крови после их гидролиза при кипячении с соляной кислотой не заслуживает большого доверия вследствие того, что трихлоруксусная кислота не осаждает белки полностью, в особенности при такой слабой ее концентрации. Недоосажденные белки при кислотном гидролизе могут поэтому обуславливать нарастание аминокислотного азота и в отсутствие полипептидов. К такому выводу пришел в

последнее время и один из авторов этого способа (13). Большой помехой служит и тот факт, что увеличение аминоказота при кислотном гидролизе происходит также за счет других веществ, находящихся в фильтратах крови, как, например, уреидов кислот, гиппуровой кислоты и др.

Еще менее пригоден способ определения полипептидов по разнице остаточного азота в трихлоруксусных и фосфорновольфрамowych фильтратах. Дело в том, что фосфорновольфрамовая кислота осаждает хорошо не только полипептиды, содержащие гексоновые основания, но и свободные аминокислоты — аргинин, гистидин и лизин. Полипептиды же, построенные из других аминокислот, плохо или совсем не осаждаются фосфорновольфрамовой кислотой. С другой стороны, как уже указывалось, трихлоруксусная кислота не осаждает белки крови полностью. Малая достоверность определения полипептидов путем титрования карбоксильных групп при различной концентрации спирта отмечалась неоднократно.

Приведенные причины и послужили поводом для выполнения настоящей работы. Несколько лет тому назад одним из нас был разработан энзиматический метод для определения дипептидов мышечной ткани — карнозина и ансерина (14). Нам представлялось, что этот способ с успехом может быть применен и для выяснения природы продуктов белкового переваривания, попадающих в кровяную систему из кишечника. Не было никаких сомнений, что наличие полипептидов в фильтратах крови наиболее легко обнаружить по увеличению аминоказота после гидролиза ферментами эрепсинового комплекса слизистой оболочки тонкого кишечника или коркового слоя почек. Вряд ли надо доказывать, что энзиматический способ, благодаря своей специфичности для данной цели, свободен от всех недостатков прежних методов определения полипептидов. Одновременно мы полагали, что в случае обнаружения, помимо аминокислот, более крупных осколков белковой молекулы в крови опытных животных применение очищенных энзимов из группы пептидаз — дипептидазы, аминокполипептидазы и карбоксиполипептидазы — поможет и в выяснении структуры этих полипептидов.

Наши исследования были проведены в форме острых и хронических опытов. Острые опыты ставились на кошках, хронические — на ангиостомированных собаках, которым накладывалась канюля на воротную вену по методу Е. С. Лондона (3). Анализ крови у опытных животных производился натощак после 20—24-часового голодания и после дачи богатой белковой пищи — собакам 400—500 г, кошкам 100—200 г мясного фарша, печени или творога. В опытах на собаках бралось из воротной вены по 25—30 мл крови натощак и спустя 3 часа после кормления; у кошек — 50—100 мл крови из сонной артерии через 8—10 час. после дачи пищи, так как оказалось, что у них только к этому периоду наступает наиболее сильное всасывание продуктов белкового переваривания. В качестве контроля здесь служило исследование крови голодных кошек. Белки коагулировались таким образом, что взятая кровь быстро смешивалась с 4-кратным количеством горячей дистиллированной воды, раствор слабо подкислялся 10% уксусной кислотой и подвергался кипячению. Осадок отфильтровывался, фильтрат после измерения выпаривался на водяной бане с таким расчетом, чтобы 1 мл соответствовал 2 мл взятой крови. В фильтрате определялся остаточный азот и аминоказот в микроаппарате Ван-Слайка до и после ферментативного гидролиза. Ферментным раствором служила глицериновая вытяжка коркового слоя почек кошки, энзиматическая активность которой предварительно проверялась по расщеплению глицил-глицина и *dl*-лейцил-глицина. В отдельный опыт бралось 2 мл сконцентрированного фильтрата крови, 1 мл 0,1 M фосфатного буфера pH 7,8, 0,5 мл раствора фермента и 3—4 капли хлороформа. Контрольные пробы содержали 1 мл фосфатного буфера и 0,5 мл раствора фермента. Пробирки закрывались резиновыми пробка-

ми и ставились на 24 часа в термостат. После инкубации в термостате к одной контрольной пробе прибавлялось 2 мл сконцентрированного филътрата крови, к другой — 2 мл дистиллированной воды. Для осаждения оставшихся в растворе белков в контрольные и опытные пробирки прибавлялось по 1,5 мл 10% раствора трихлоруксусной кислоты.

Таблица 1

NH₂N и остаточный азот в мг %

Животные	Белковая пища	пищи в г	NH ₂ N						Увеличение NH ₂ N после кормления	Остаточный N	
			до кормления			после кормления				до кормления	после кормления
			до гидролиза	после гидролиза	разница	до гидролиза	после гидролиза	разница			
Кошка	Мясо	100	9,4	10,4	1,0	17,8	17,8	0	8,4	36,8	73,1
	Творог	100				14,5	14,4	0,9	6,0		48,7
	Печень	150				11,7	11,7	0	2,3		70,0
Собака	Мясо	400	9,6	10,3	0,7	17,7	18,9	1,2	9,3	24,91	68,6
	Творог	400				13,5	14,1	0,6	4,5		46,2

В табл. 1 приведены средние данные наших опытов. Полученные результаты показывают резкое увеличение аминокислот и остаточного азота в крови опытных животных после дачи богатой белком пищи. Из этой же таблицы видно, что обнаружить полипептиды в крови кошек и собак до и после дачи пищи не удалось. Таким образом, не остается сомнений, что всасывание продуктов белкового переваривания происходит исключительно в форме аминокислот.

Аналогичные результаты, появившиеся в печати уже после окончания наших исследований (15), были получены и при использовании метода распределительной хроматографии на бумаге. Однако в дополнении к этой работе отмечается, что во время всасывания продуктов белкового переваривания наблюдается появление в незначительном количестве связанных аминокислот, судя по увеличению аминокислот после кислотного гидролиза ультрафильтратов крови (16). О ненадежности результатов, полученных этим путем, мы уже указывали выше. Кроме того, подобное явление происходит при даче не только белков, но и свободных аминокислот. Поэтому имеется мало оснований рассматривать эти соединения как полипептиды.

Институт экспериментальной медицины
Академии медицинских наук СССР
Ленинград

Поступило
4 I 1941

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ И. П. Павлов, Полное собр. трудов, 2, 628, 1946. ² Е. С. Лондон, Физиология и патология пищеварения, 1924. ³ Е. С. Лондон, Ангиостомия и обмен веществ в органах, М., 1935. ⁴ Е. С. Лондон и Н. П. Кочнева, Арх. биол. наук, 37, 3 (1935). ⁵ Н. П. Кочнева, Pflüg. Arch., 214, 343 (1926); 218, 635 (1928). ⁶ С. Мирополюский, Диссертация, Л., 1938. ⁷ F. Verzar, Absorption from Intestine, 1936. ⁸ H. Lombroso, Boll. Soc. ital., Biol. sper., 13, 489 (1938); цит. по Rona's Ber., 110, 580 (1939). ⁹ A. Hiller and D. van Slyke, Journ. Biol. Chem., 53, 253 (1922). ¹⁰ P. Cristol et A. Puech, Bull. de la Soc. des sciences de Montpellier, 7, 48 (1925); цит. по Rona's Ber., 36, 842 (1926). ¹¹ M. Goiffon et I. Spacy, Bull. Soc. Chim. Biol., 16, 1675 (1934). ¹² R. Willstätter u. E. Waldschmidt-Leitz, Ber. Chem. Ges., 54, 2988 (1921). ¹³ W. Beckmann, A. Hiller, T. Schedlovsky and K. Archibald, Journ. Biol. Chem., 148, 247 (1943). ¹⁴ А. Н. Паршин, Биохимия, 4, 555 (1939). ¹⁵ E. D. Dent and J. A. Schilling, Biochem. Journ., 44, 318 (1949). ¹⁶ H. N. Christensen, ibid., 44, 333 (1949).