

УДК 616.34-008.6-092

Два механизма мембранного пищеварения: ферментативно-транспортный ансамбль существует и для олигопептидов

С.Т. Метельский^{1,3}, В.Т. Ивашкин²¹ГУ НИИ общей патологии и патофизиологии РАМН, Москва,²ГОУ ВПО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова»,³ГОУ ВПО «Российский государственный медицинский университет»

Two mechanisms of membrane digestion: enzymatic-transport ensemble exists for oligopeptides as well

S.T. Metelsky, V.T. Ivashkin

Цель исследования. Определить, какой механизм транспорта дипептидов реализуется в созданных в ходе эксперимента условиях – транспорт интактных дипептидов через PEPT1 или транспорт высвободившихся в результате мембранного гидролиза дипептидов аминокислот через системы транспорта для свободных аминокислот.

Материал и методы. На изолированных отрезках тонкой кишки крыс регистрировали величины ответов тока короткого замыкания (ТКЗ), характеризующих скорость Na^+ -зависимого всасывания нутриентов, на добавление в омывающий раствор дипептидов и аминокислот при различных pH.

Результаты. Установлено, что при pH 8,5 наблюдается большая эффективность дипептидного транспорта (ответы ТКЗ на дипептиды больше ответов на смесь аминокислот). Напротив, при pH 5,5 отмечается обратное соотношение – ответы ТКЗ на смесь аминокислот больше ответов на дипептиды. Таким образом, исследователь, работая при pH 5,5, обнаружит, что всасывание из смеси аминокислот протекает более эффективно, чем из раствора дипептида.

Выводы. Увеличивающийся с pH натрийзависимый компонент стимулирующего эффекта легко

Aim of investigation. To determine, which mechanism of dipeptide transport is realized under experimental conditions: PEPT1-mediated transport of the intact dipeptides or transport of the amino acid formed as a result of membrane hydrolysis of dipeptides through transport systems for free amino acid.

Material and methods. Amplitudes of short circuit current (SCC) response reflecting rate of Na^+ -dependent absorption of nutrients on addition of dipeptides and amino acids to washing solution at different pH were registered in isolated fragments of the small intestine of rats.

Results. Higher efficacy of dipeptide transport (SCC responses to dipeptides were more intensive, than responses to amino acids mixture) was observed at pH 8,5. On the contrary, at pH 5,5 is inverse ratio: stronger SCC responses to amino acid mixture than to dipeptides was revealed. Thus, the explorer, working at pH 5,5, will find, that absorption from mixture of amino acids is more effective, than from dipeptide solution.

Conclusions. Increase of sodium-dependent component of stimulating effect of easily hydrolyzed dipeptides along with pH is caused by membrane digestion. Decrease of sodium-independent dipeptide transport component along with pH is related, apparently, to func-

Метельский Сергей Тимофеевич – доктор биологических наук, главный научный сотрудник НИИ общей патологии и патофизиологии РАМН. Контактная информация для переписки: S.T.Metelsky@gmail.com; 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8, НИИ ОПП РАМН

Ивашкин Владимир Трофимович – академик РАМН, доктор медицинских наук, профессор, зав. кафедрой пропедевтики внутренних болезней ГОУ ВПО ПМГМУ им. И.М. Сеченова. Контактная информация для переписки: v.ivashkin@gastro-j.ru; 119991, Москва, ул. Погодинская, д. 1, стр. 1, клиника пропедевтики внутренних болезней, гастроэнтерологии и гепатологии им. В.Х. Василенко ГОУ ВПО ПМГМУ им. И.М. Сеченова Росздрава

гидролизующих дипептидов обусловлен мембранным пищеварением. Снижающийся с pH натрий-независимый компонент транспорта дипептидов связан, по-видимому, с функционированием в апикальной мембране энтероцитов протонзависимого PepT1. Мы полагаем, что такое последовательное «выдерживание» содержимого желудка при всевозрастающих pH по мере перемещения вдоль желудочно-кишечного тракта (от желудка к толстой кишке) приводит к своевременному переключению двух механизмов всасывания олигопептидов и соответственно к более оптимальному их усвоению.

Ключевые слова: желудочно-кишечный тракт, дипептиды, смесь аминокислот, механизм транспорта, ток короткого замыкания.

tioning of proton-dependent PepT1 in enterocyte apical membrane. We believe, that such serial «incubation» of gastric contents at increasing pH at gastro-intestinal transit (from the stomach to the large intestine) results in well-timed diversion of two mechanisms of oligopeptide absorption and respectively to their optimal digestion.

Key words: gastro-intestinal tract, dipeptides, mixture of amino acids, transport mechanism, short circuit current.

В предыдущей статье [4] нами были приведены доказательства существования гидролизно-транспортного ансамбля (ферментативно-транспортного ансамбля по А.М. Уголеву) для олигосахарида. При помощи несколько иного подхода нам удалось получить доказательства в пользу существования гидролизно-транспортного ансамбля и для олигопептидов.

Сегодня считается общепринятым, что всасывание ди- и трипептидов осуществляется специфическим механизмом (PEPT1) и, что особенно важно, более эффективно, чем всасывание соответствующих аминокислот. Имеются данные, свидетельствующие о более быстром всасывании из смеси мономеров по сравнению с всасыванием соответствующего дипептида [5, 9, 10]. Всасывание нутриентов, в частности аминокислот и дипептидов, может происходить сопряженно с натрием или протоном соответственно [7, 9, 10]. В обоих случаях при добавлении в мукозный (омывающий слизистую оболочку) раствор указанных нутриентов через эпителиальный пласт должен протекать дополнительный электрический ток, который удобнее всего регистрировать методом тока короткого замыкания (ТКЗ).

Как же определить, какой механизм транспорта дипептидов реализуется в данных условиях — транспорт интактных дипептидов через PEPT1 или транспорт высвободившихся в результате мембранного гидролиза дипептидов аминокислот через системы транспорта для свободных аминокислот? Путем использования величины изменения ТКЗ в ответ на добавление нутриента в мукозный раствор в качестве характеристики всасывания в настоящем исследовании показано, что в зависимости от pH мукозного раствора величина ответа ТКЗ на добавление дипептида (или эффективность всасывания дипептида) может быть больше или меньше ответа ТКЗ на эквимоллярную смесь соответствующих аминокислот (или эффективность всасывания смеси аминокислот). Результаты работы были частично опубликованы ранее [2].

Материал и методы исследования

Опыты проведены на изолированных, распластанных отрезках медиальных отделов тонкой кишки крыс (Вистар, самцы, масса 160–210 г), голодавших до опыта 16–18 ч при свободном доступе к воде. Для характеристики активного транспорта ионов использовали метод ТКЗ в нашей модификации [1, 3]. В эксперименте использовали модифицированные растворы Рингера — натриевый раствор, содержащий 80 мМ Na_2SO_4 , 5,6 мМ KCl , 2,2 мМ CaCl_2 , 2,05 мМ NaHCO_3 (в этих условиях величина ТКЗ отражает скорость активного транспорта ионов натрия), и безнатриевый раствор, в котором 80 мМ Na_2SO_4 и 2,05 мМ NaHCO_3 были замещены соответственно на 80 мМ K_2SO_4 и 2,05 мМ KHCO_3 . При pH 8,5 в растворе содержалось 5 мМ трис, а при pH 5,5 — 5 мМ морфолиноэтансульфоновой кислоты. Добавление и удаление нутриентов осуществлялось изотонично взамен эквимоллярного количества маннита. Основной методический прием — регулярное сравнение ответов ТКЗ через стенку тонкой кишки на добавление в омывающий раствор дипептида или смеси образующих его аминокислот, взятых в соотношении 1:1

Опыты проведены при температуре 25–27 °С. Использованы нутриенты фирмы «Sigma» (США) и неорганические реактивы (отечественные марки х. ч.). Статистическая обработка результатов проводилась с использованием *t*-критерия Стьюдента.

Результаты исследования и их обсуждение

В диапазоне pH 5,5–8,5 нами изучены следующие характеристики: 1) ответы ТКЗ на дипептиды; 2) ответы ТКЗ на эквимоллярную смесь соответствующих данному дипептиду аминокислот. В соответствии с общепринятым взглядом [5, 9, 10] у нас при pH 8,5 ответы ТКЗ на дипептиды

(глицил-L-лейцин, глицил-DL-метионин или глицил-L-аланин) выше ответов на смесь аминокислот (см. таблицу, рис. 1). Разница между этими двумя типами ответов невелика, но она проявляется в каждом опыте. Согласно концепции о более эффективном транспорте дипептидов [5, 9, 10] такие же соотношения должны иметь место при любых рН. Однако неожиданно выяснилось, что при рН 5,5 ответы ТКЗ на смесь аминокислот несколько выше ответов на дипептиды (см. таблицу).

С целью выявления регулярности обнаруженного феномена мы зарегистрировали ответы ТКЗ на более высокие и более низкие концентрации других дипептидов – 20 мМ глицил-DL-лейцина и

5 мМ глицил-L-тирозина. В обоих случаях ответы ТКЗ на сумму аминокислот выше, чем ответы на дипептиды. Выявленный феномен характерен не только для глицинсодержащих дипептидов, но и для DL-аланил-DL-аспарагина (см. таблицу).

Во всех трех случаях указанные различия отмечаются в каждом отдельном опыте. Ответы ТКЗ на мономеры нутриентов при увеличении рН ведут себя различным образом – могут как возрастать, так и снижаться.

При изучении рН-зависимости эффективности всасывания различных дипептидов выяснилось, что в отличие от глицил-DL-метионина, глицил-L-лейцина и глицил-L-аланина ответы ТКЗ на глицил-глицин и карнозин (β -аланил-L-гистидин)

Ответы тока короткого замыкания (мкА/см²) через стенку тонкой кишки на добавление в мукозный раствор дипептидов и эквимольной смеси соответствующих аминокислот при различных рН

Нутриенты	рН	
	8,5	5,5
10 мМ глицин + 10 мМ DL-метионин	8,8±3,0 (6)	13,8±3,3 (7)
10 мМ глицил-DL-метионин	11,5±2,1 (9)	7,6±1,2 (10)
10 мМ глицин + 10 мМ L-лейцин	10,3±2,7 (5)	11,0±3,5 (8)
10 мМ глицил-L-лейцин	15,1±4,8 (6)	9,5±1,8 (10)
10 мМ глицин + 10 мМ L-аланин	15,0±1,9 (5)	14,6±2,4 (4)
10 мМ глицил-L-аланин	21,3±7,7 (7)	13,4±1,8 (5)
20 мМ глицин + 20 мМ DL-лейцин	—	17,0±6,5 (3)
20 мМ глицил-DL-лейцин	—	12,5±6,0 (4)
20 мМ DL-аланин + 20 мМ DL-аспарагин	—	17,5±2,5 (4)
20 мМ DL-аланил-DL-аспарагин	—	7,8±0,3 (4)
5 мМ глицин + 5 мМ L-тирозин	—	15,4±3,2 (3)
5 мМ глицил-L-тирозин	—	8,6±1,6 (4)

Примечание. В скобках указано число опытов. Результаты представлены в виде $M \pm m$.

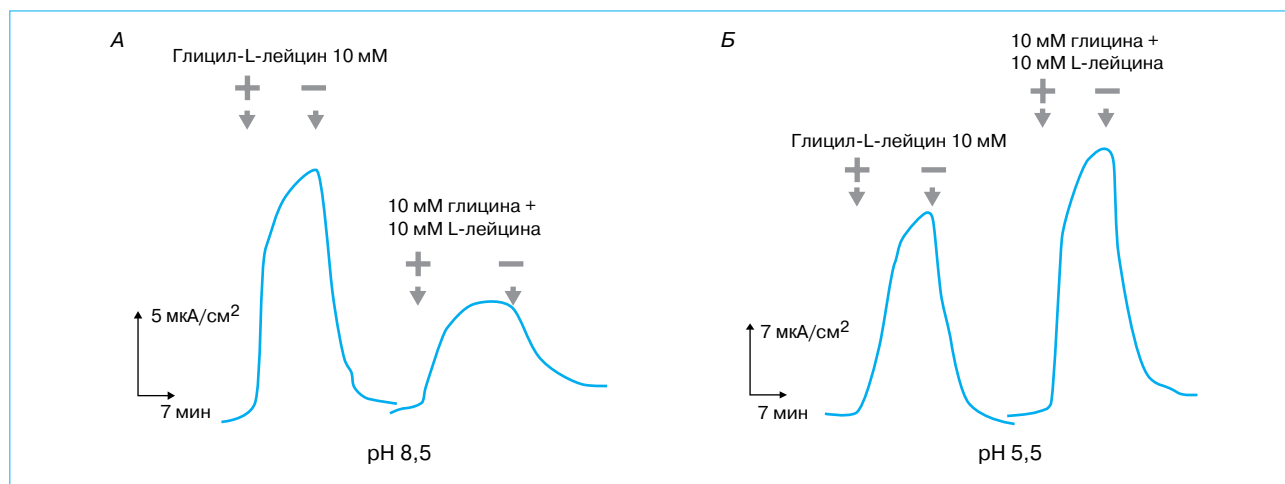


Рис. 1. А – ответы ТКЗ через резецированные отрезки тонкой кишки крыс на дипептид (глицил-L-лейцин 10 мМ) и на смесь аминокислот (10 мМ глицина + 10 мМ L-лейцина) при рН 8,5
Б – ответы ТКЗ через резецированные отрезки тонкой кишки крыс на дипептид (глицил-L-лейцин 10 мМ) и на смесь аминокислот (10 мМ глицина + 10 мМ L-лейцина) при рН 5,5

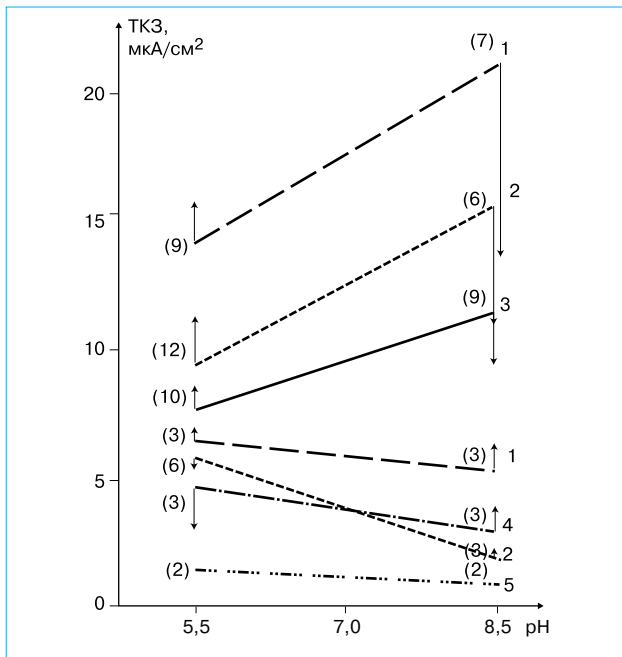


Рис. 2. pH-зависимости стимулирующих эффектов 10 мМ дипептидов на ТКЗ через стенку тонкой кишки, зарегистрированные в присутствии (возрастание с pH) и при отсутствии (убывание с pH) в омывающих растворах натрия
1 — глицил-L-аланин, 2 — глицил-L-лейцин, 3 — глицил-DL-метионин, 4 — глицил-глицин, 5 — карнозин. Вертикальные стрелки — половина средней квадратичной ошибки. В скобках указано число опытов

с увеличением pH имеют тенденцию к уменьшению (рис. 2). При удалении натрия из растворов (pH 8,5) ответы ТКЗ на глицил-L-аланин ($p < 0,1$) и глицил-L-лейцин ($p < 0,05$) уменьшаются, но все же остаются на довольно высоком уровне. Более важно то обстоятельство, что с увеличением pH ответы ТКЗ на два указанных дипептида имеют тенденцию к уменьшению.

Итак, нами при кислом (5,5) и щелочном (8,5) pH с использованием метода ТКЗ изучен эффект удаления из омывающих растворов натрия при добавлении в мукозный раствор дипептидов, аминокислот и глюкозы. При этом впервые удалось наблюдать несколько важных феноменов. Так, в рамках наших экспериментов находит объяснение упоминавшаяся выше, но не получившая удовлетворительного истолкования вариабельность относительной эффективности дипептидного транспорта.

Согласно полученным данным, исследователь, работая при pH 8,5, будет наблюдать большую эффективность дипептидного транспорта, так как ответы ТКЗ на дипептиды несколько больше ответов на смесь аминокислот (см. рис. 1А). Напротив, при pH 5,5 отмечается обратное соотношение — ответы ТКЗ на смесь аминокислот больше ответов на дипептиды (см. рис. 1Б). Таким образом, при pH 5,5 всасывание из смеси

аминокислот протекает более эффективно, чем из раствора дипептида.

По нашим наблюдениям, при нейтральных pH соотношение между эффективностями всасывания из раствора дипептида и из раствора, содержащего смесь аминокислот, может быть любым. Следовательно, довольно широко распространенная процедура определения эффективности дипептидного транспорта путем сравнения при нейтральных pH скорости всасывания из раствора смеси аминокислот и из раствора, содержащего дипептид, некорректна.

Некоторые исследователи [3, 5, 7, 8, 9, 10, 12] считают, что транспорт дипептидов через апикальную мембрану энтероцитов может происходить двумя путями: сопряженный с протоном перенос интактных дипептидов и сопряженный с натрием перенос мономеров (аминокислот), образовавшихся в результате мембранного гидролиза дипептидов. Для устранения натрийзависимого компонента ответов ТКЗ мы поставили опыты в безнатриевом растворе.

После удаления натрия pH-зависимость стимулирующего эффекта дипептидов радикально изменилась. Обнаружилось, что натрийзависимый компонент ответа с увеличением pH возрастает, а протонзависимый уменьшается (см. рис. 2, 3). Это наблюдение согласуется с данными, полученными при изучении стимулирующего эффекта дипептида на трансмембранную разность потенциалов через стенку тонкой кишки жабы [6].

Установлено, что аминоклотазные активности щеточной каймы энтероцитов имеют максимум

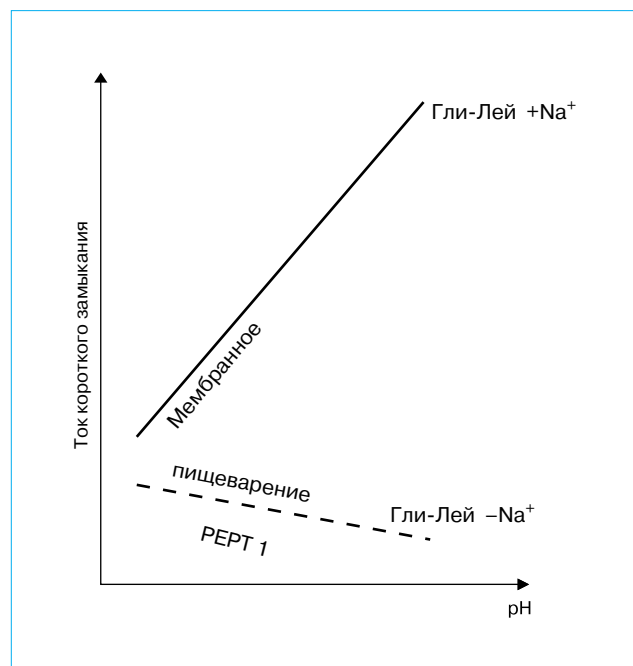


Рис. 3. Соотношение между двумя механизмами всасывания дипептидов при кислом и щелочном pH

мы при $\text{pH} \approx 8$ [5, 11]. Поэтому мы, как и авторы названного выше исследования [6], полагаем, что увеличивающийся с pH натрийзависимый компонент стимулирующего эффекта легко гидролизуемых дипептидов обусловлен мембранным пищеварением. Если это так, то стимулирующий эффект плохо гидролизуемых дипептидов с увеличением pH должен вести себя как эффект хорошо гидролизуемых дипептидов в безнатриевом растворе, т. е. должен уменьшаться. Так и оказалось: ответы ТКЗ на глицил-глицин и карнозин с ростом pH уменьшались. Согласно полученным ранее данным [6], стимулирующий эффект глицил-глицина с увеличением pH несколько возрастет, а у нас (см. рис. 3) уменьшается. Это расхождение, возможно, обусловлено тем, что в тонкой кишке жабы глицил-глицин гидролизует более легко, чем у крысы.

Известно, что содержимое желудка, имеющее очень низкий pH , поступает в тонкую кишку, где его pH по мере продвижения вдоль *желудочно-кишечного тракта* (ЖКТ) увеличивается до значений, характерных для слабощелочных рас-

творов. При этом (см. рис. 3) в проксимальных отделах ЖКТ более существенным будет вклад транспортера для олигопептидов — $\text{P}^{\text{E}}\text{RT}1$, а в дистальных отделах основную роль начинают играть процессы с участием гидролизно-транспортных ансамблей.

Такое «сканирование» содержимого желудка по pH по мере перемещения вдоль ЖКТ, на наш взгляд, приводит к своевременному переключению механизмов всасывания олигопептидов, что обуславливает их более полное усвоение. Эти выводы нашли подтверждение и при выполнении нижеуказанного гранта. Более того, мы полагаем, что нами впервые открыт новый принцип регулирования пищеварительно-транспортных процессов в кишечнике — использование значительного градиента pH вдоль желудочно-кишечного тракта для оптимизации пищеварения и всасывания.

Работа поддержана грантом РФФИ 09-04-01698.

Список литературы

1. Метельский С.Т. Изучение активного транспорта натрия через слизистую оболочку кишки крысы при помощи автоматического непрерывного фиксатора потенциала // Бюлл. эксперим. биол. мед. — 1984. — Т. 97. — С. 563–565.
2. Метельский С.Т. pH -зависимость ионных токов, обусловленных котранспортом с нутриентами, через стенку тонкой кишки крыс: Доклады Акад. наук СССР. — 1989. — Т. 308, № 5. — С. 1270–1273.
3. Метельский С.Т. Транспортные процессы и мембранное пищеварение в слизистой оболочке тонкой кишки. — М.: Анахарсис, 2007. — 271 с.
4. Метельский С.Т., Ивашкин В.Т. Два механизма мембранного пищеварения: ферментативно-транспортный ансамбль существует // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. — 2010. — Т. 20, № 5. — С. 4–9.
5. Уголев А.М. Мембранное пищеварение. Полисубстратные процессы, организация и регуляция. — Л.: Наука, 1972. — 172 с.
6. Abe M., Hoshi T., Taijama A. Characteristics of transmural potential changes associated with the proton-peptide co-transport in toad small intestine // J. Physiol. — 1987. — Vol. 394. — P. 481–499.

7. Hoshi T., Himukai M. Na^+ -coupled transport of organic solutes in animal cells // Transport and bioenergetics in biomembranes / Eds. R. Sato, Y. Kagawa. — Tokyo: Japan Sci. Soc. Press.; Plenum Press, 1982. — P. 111–135.
8. Kushak R.I., Basova N. The absorption of free and «peptide» amino acids in small intestine of Chicks // Comp. Biochem. Physiol. — 1988. — Vol. 89A, N 3. — P. 317–322.
9. Matehews D.M. Intestinal absorption of peptides // Physiol. Rev. — 1975. — Vol. 55, N 4. — P. 537–608.
10. Matthews D.M., Payne J.M. Transmembrane transport of small peptides // Current topics in membranes and transport / Eds. F. Bronner, A. Kleinzeller. — N.Y.: Acad. Press, 1980. — Vol. 14. — P. 331–425.
11. Robinson G.B., Shaw B. The hydrolysis of dipeptides different regions of rat small intestine // Biochem. J. — 1960. — Vol. 77, N 2. — P. 351–356.
12. Rubino A., Field M., Shwachman H. Intestinal transport of amino acid residues of dipeptides. I. Influence of the glycyl-L-proline across mucosal border // J. Biol. Chem. — 1971. — Vol. 246, N 11. — P. 3542–3548.