

УДК 612.332.08

Два механизма мембранного пищеварения: ферментативно-транспортный ансамбль существует

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 Росздрав»,³ГОУ ВПО «Российский государственный медицинский университет Росздрав»)

Two mechanisms of membrane digestion: enzymatic-transport ensemble exists

S.T. Metelsky, V.T. Ivashkin

Цель исследования. У крыс и человека проанализировать начальные стадии взаимодействия между мембранным гидролизом нутриентов (димеры сахаров) и всасыванием образовавшихся при этом мономеров.

Материал и методы. Электрофизиологические опыты проведены на резецированных отрезках тонкой кишки крыс (85 животных) массой 160–550 г. В группе больных было 19 человек в возрасте 17–80 лет с синдромом абдоминальной ишемии, хроническим гастритом, язвенной болезнью желудка, синдромом раздраженного кишечника. Использовали метод измерения тока короткого замыкания (ТКЗ) в нашей модификации. Величины ответов тока на добавление нутриентов (мономеров и димеров сахаров) в раствор, омывающий слизистую оболочку, принимали, как принято до сих пор, в качестве меры скорости Na^+ -зависимого всасывания нутриентов.

Результаты. Ответы ТКЗ на глюкозу и мальтозу, взятые в концентрации 2:1, при всех испытанных условиях (85 пар) оказались практически равными. Коэффициент корреляции составил 0,992, уравнение линейной регрессии $A_{\text{гл}} = 0,1 + 1,05 \times A_{\text{мл}}$. По мере подхода молекул мальтозы к поверхности энтероцитов они без какой-либо задержки, необходимой для заполнения объема некоего гипотетического примембранного слоя молекулами высвободившейся глюкозы, участвуют в развитии ответа тока короткого замыкания. Следовательно, у крыс

Aim of investigation. To analyze initial stages of coupling between membrane hydrolysis of nutrients (sugar dimers) and membrane transport of formed monomers in rats and humans.

Material and methods. Electrophysiological experiments carried out on resected segments of small intestine of rats weighted 160 to 550 g (85 animals). The group of patients included 19 person in the age of 17–80 years with abdominal ischemia syndrome, chronic gastritis, gastric ulcer, irritable bowel syndrome. Method of gastric of *short circuit current* (SCC) in original modification was used. Values of responses of current to addition of nutrients (monomers and sugar dimers) in the mucosa-washing solution, used accepted, as it is consented up to now, as a measure of Na^+ -dependent nutrient absorption rate.

Results. SCC responses to glucose and maltose taken in 2:1 concentration, under all tested conditions (85 pairs) appeared almost equal. The correlation coefficient was 0,992, linear regression equation was $A_{\text{gl}} = 0,1 + 1,05 \times A_{\text{ml}}$. Along with approach of maltose molecules to surface of enterocytes they without any delay, that could be necessary to fill certain hypothetical near-membrane layer by molecules of released glucose, participate in development of the response of short circuit current. Hence, in rats Na^+ -dependent transport (absorption) of maltose and glucose is carried out by the same enzymatic-transport ensemble.

For humans statement of the question on existence of enzymatic-transport ensemble due to initial dispar-

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

Na⁺-зависимый транспорт (всасывание) мальтозы и глюкозы осуществляет один и тот же ферментативно-транспортный механизм.

У человека постановка вопроса о существовании ферментативно-транспортного ансамбля ввиду исходного неравенства последовательных ответов на мальтозу (5 мМ) и глюкозу (10 мМ) не имеет смысла.

Выводы. У крыс Na⁺-зависимый транспорт мальтозы и глюкозы осуществляет один и тот же механизм. В щеточной кайме энтероцитов животных существует ферментативно-транспортный ансамбль, расщепляющий молекулу мальтозы на две молекулы глюкозы, которые непосредственно передаются на вход в транспортную систему (А.М. Уголев). У человека такой ферментативно-транспортный ансамбль отсутствует. Свободная и мальтозная глюкоза, по-видимому, транспортируются через щеточную кайму энтероцитов с помощью двух различных механизмов.

Ключевые слова: мембранное пищеварение, мальтоза, глюкоза, ток короткого замыкания.

ity of serial responses to maltose (5 mM) and glucose (10 mM) makes no sense.

Conclusions. In rats Na⁺-dependent transport of maltose and glucose is carried out by the same mechanism. In enterocyte brush border of animals there is enzymatic-transport ensemble splitting molecules of maltose in two molecules of glucose which are immediately transferred to transport system entrance (A.M. Ugolev). In humans such enzymatic-transport ensemble is absent. Free and maltose glucose, apparently, are transported through brush border of enterocytes by two various mechanisms.

Key words: digestion absorption, maltose, glucose, short circuit current, ussing chamber.

Известно, что принципиально новое явление в усвоении поступающих в организм различных соединений из внешней среды было открыто А.М. Уголевым [4, 8]. Логически завершенный (на наш взгляд очень удачный) термин для сжатого описания открытого явления — «мембранное пищеварение» был предложен им ровно 50 лет назад. Концепция мембранного пищеварения экспериментально и теоретически развивалась и в последующие годы [9], когда был сформулировано положение о ферментативно-транспортном или гидролизно-транспортном ансамбле. Суть данной концепции, покоящейся в основном на косвенных данных, заключается в том, что молекулы питательного вещества (нутриента) гидролизуются поверхностными ферментами щеточной каймы энтероцитов и затем *без*

выхода в окружающий раствор попадают на вход в транспортную систему (рис. 1).

Согласно другому механизму гидролизованные мембранными ферментами нутриенты сначала заполняют некий объем или примембранный слой, после чего с помощью специальных транспортеров переносятся в клетки (рис. 2). Существование механизма ферментативно-транспортного ансамбля (когда продукты гидролиза нутриента не выходят в окружающий раствор) до сих пор не установлено. Нам удалось получить прямые доказательства наличия ферментативно-транспортного ансамбля в тонкой кишке крысы.

Материал и методы исследования

Опыты проведены на изолированных распластанных вдоль контрамецентральной линии отрезках проксимальных (первая треть), медиальных (вторая треть) и дистальных (оставшаяся треть) отделов тонкой кишки крыс (85 животных) массой 160–550 г (Вистар, самцы).

В группу больных входили 19 человек в возрасте 17–80 лет с синдромом абдоминальной ишемии, хроническим гастритом, язвенной болезнью желудка, синдромом раздраженного кишечника [2, 3].

Резецированные отрезки тонкой кишки крыс и распластанные биоптаты слизистой оболочки залуковичного отдела тощей кишки помещали в экспериментальные камеры Юссинга [3, 7].

Использовали метод измерения *тока короткого замыкания* (ТКЗ) в нашей моди-

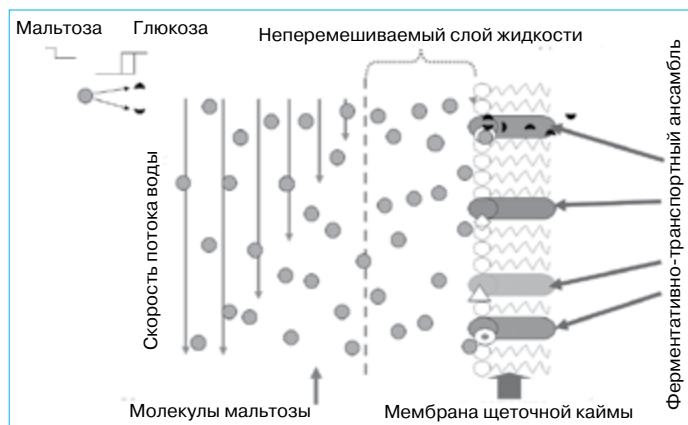


Рис. 1. Две основные теории, объясняющие феномен эффективного всасывания мальтозы (глюкоза + глюкоза). Ферментативно-транспортный ансамбль

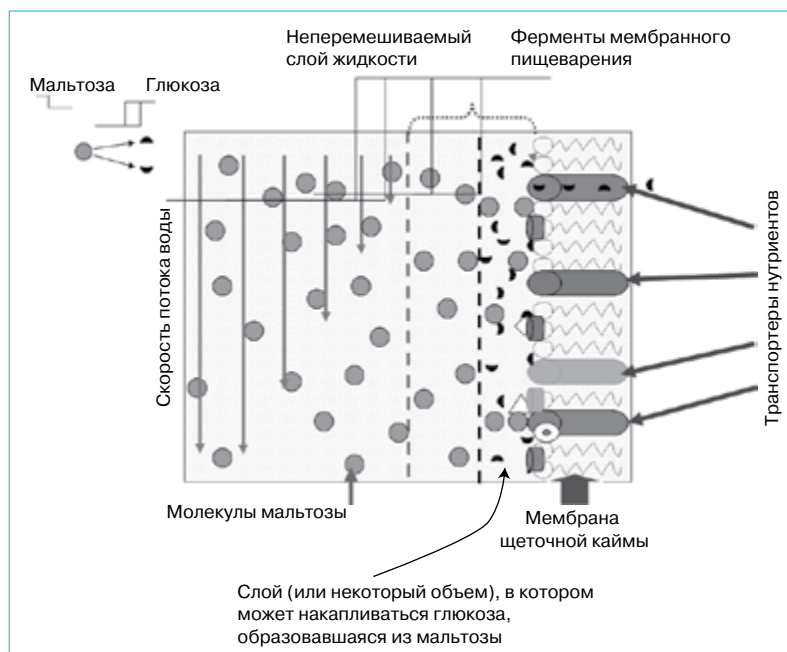


Рис. 2. Две теории, объясняющие феномен эффективного всасывания мальтозы (глюкоза + глюкоза) у крысы. Заполнение некоего примембранного слоя или объема мальтозной глюкозой

фикации [1, 2]. Величины ответов тока на добавление мономеров и димеров нутриентов в раствор, омывающий слизистую оболочку (мукозу), принимали, как принято до сих пор, в качестве меры скорости Na^+ -зависимого всасывания нутриентов [1, 2, 5–7]. Применяли модифицированный раствор Рингера (рН 7,4), 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. Опыты проведены при температуре 25–27 °С. Основной методический прием, использованный в данной работе, — регулярное сравнение ответов тока короткого замыкания через стенку тонкой кишки на добавление свободной глюкозы и димера (мальтозы), взятых в соотношении 2:1 (по концентрации). Оксигенировали только серозный раствор.

Использованы нутриенты фирмы «Reanal» (Венгрия), неорганические реактивы отечественные марки х.ч. Статистическая обработка результатов проводилась с применением t -критерия Стьюдента.

Результаты исследования

С самого начала эксперимента оказалось, что при добавлении мальтозы (5 мМ) или глюкозы (10 мМ) к раствору, омывающему слизистую оболочку кишки, развиваются ответы ТКЗ примерно одинаковой величины (рис. 3). Более того при анализе результатов, полученных ранее (табл. 1, [2]) установлено, что близки не только величины указанных ответов, но и относительные

начальные скорости развития ответов на мальтозу и глюкозу: отношение относительных начальных скоростей развития ответов на мальтозу и глюкозу равно 0,90 ($n=18$). Мы проанализировали данные феномены более тщательно.

При чрезвычайно широком варьировании условий исследования — возраст животных (от 4,5 до 22 мес), температура препарата в экспериментальной камере (от 10 до 37 °С), локализация резецированного участка вдоль тонкой кишки (проксимальный, медиальный, дистальный), время, прошедшее с начала опыта (от 10 мин до 4 ч), состояние животных (сытые, голодные), состав рингеровского раствора (на основе NaCl или Na_2SO_4), концентрация добавляемых сахаров (от 1 до 10 мМ, по глюкозе), концентрация ингибитора активного транспорта Na^+ убаина (от 0 до 0,5 мМ) — ответы ТКЗ на глюкозу и мальтозу, взятые в концентрации 2:1, оказались

практически равными (см. рис. 3). Коэффициент корреляции составил 0,992, уравнение линейной регрессии $A_{\text{гл}} = 0,1 + 1,05 \times A_{\text{мл}}$.

На тонкой кишке крысы мы исследовали связь между скоростью гидролиза димеров сахаров, состоящих из мономеров, каждый из которых способен стимулировать ТКЗ, и величиной ответа на данный дисахарид. Для этого сравнили эффекты димеров сахаров, гидролизующихся в кишечнике с различной скоростью. Негидролизующаяся в кишечнике крыс целлобиоза (глюкоза + глюкоза, соединенные другим типом связи, чем в мальтозе) практически не приводит к стимуляции ТКЗ (рис. 4). В предварительных опытах было показано, что глюкоза и галактоза в одинако-

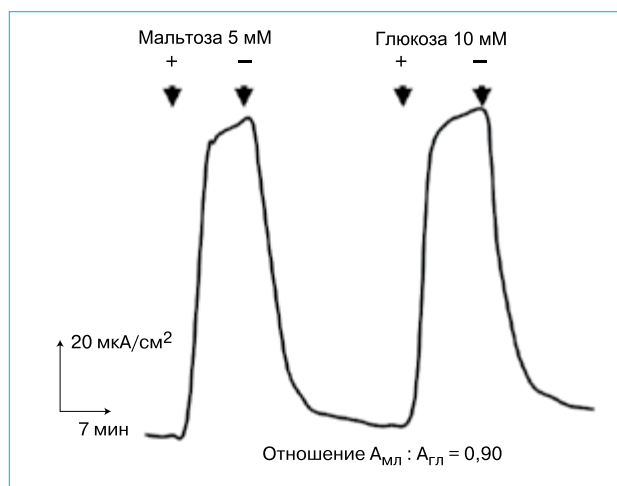


Рис. 3. Типичная пара ответов ТКЗ через тонкую кишку крысы на эквимоларные добавки мальтозы и глюкозы

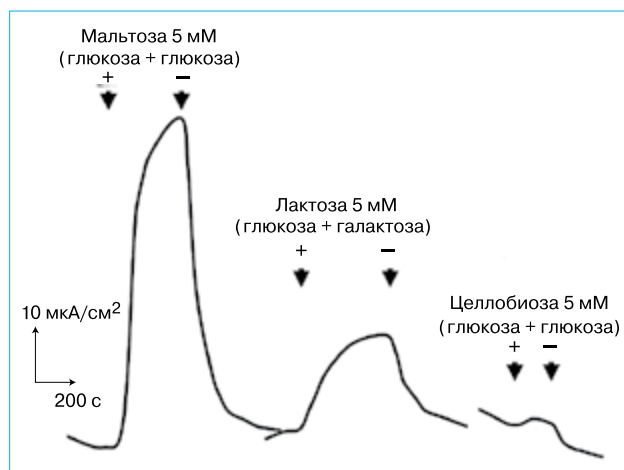


Рис. 4. Ответы ТКЗ через тонкую кишку крысы на дисахариды, гидролизующиеся у крыс с различной скоростью

вых концентрациях вызывают развитие ответов ТКЗ приблизительно одинаковой величины. Стимулирующий эффект плохо гидролизующейся у взрослых крыс 10 мМ лактозы (глюкоза + галактоза) намного меньше эффекта добавления 5 мМ мальтозы (см. рис. 4) или одновременного добавления в раствор 10 мМ глюкозы и 10 мМ галактозы или 20 мМ глюкозы (предварительные опыты).

По нашим оценкам, размеры молекулы мальтозы по трем измерениям в среднем примерно на 33% больше, чем молекулы глюкозы. Согласно закону Стокса, со стороны движущегося потока жидкости на шарик действует сила, прямо пропорциональная его радиусу. Вследствие этого эффекта со стороны потока воды концентрация мальтозы в гипотетическом слое жидкости, где может накапливаться глюкоза, образовавшаяся в результате мембранного гидролиза мальтозы, должна заметно отличаться от концентрации свободной глюкозы. Мы создавали потоки воды через препарат за счет изменения осмотических давлений по обе стороны препарата кишки путем добавления в растворы плохо проникающего и негидролизуемого сахара маннита. Оказалось, поток воды через стенку кишки, направленный от серозной поверхности к мукозной, «отжимающий» растворенные вещества от поверхности кишки, значительно снижает ответы ТКЗ на 10 мМ глюкозы и 5 мМ мальтозы в одинаковой степени — от $20,15 \pm 1,81$ ($n=6$) до $13,30 \pm 1,45$ мкА/см² ($n=3$) и от $20,15 \pm 2,00$ ($n=6$) до $13,00 \pm 1,15$ ($n=3$) соответственно ($p < 0,02$). В то же время поток воды через препарат в обратном направлении на величины ответов на мальтозу и глюкозу практически не влияет. Данное наблюдение плохо согласуется с наличием гипотетического объема или слоя жидкости, где может накапливаться мальтозная глюкоза, или этот объем недоступен для указанного потока воды.

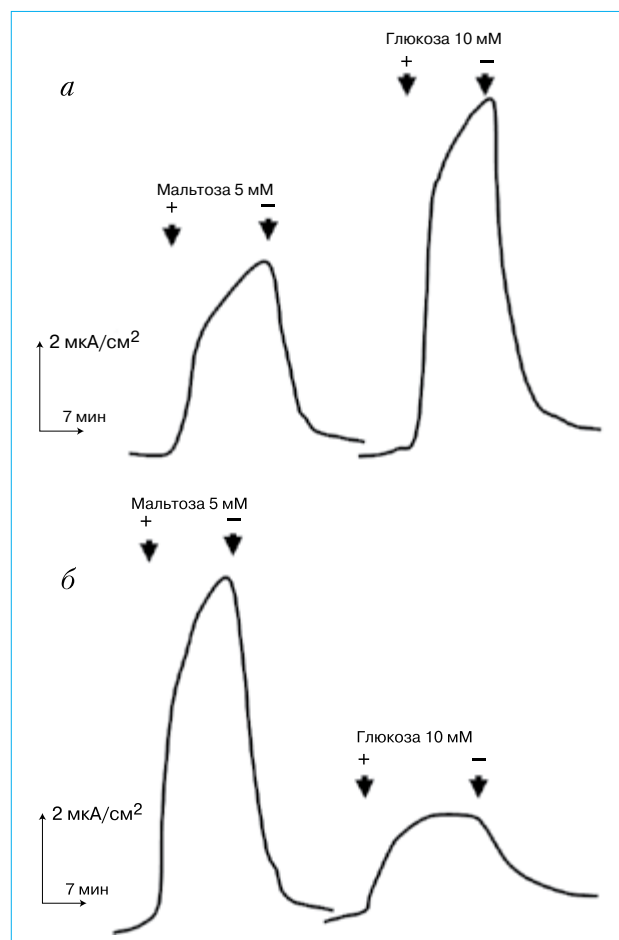


Рис. 5. Ответы ТКЗ через слизистую оболочку тонкой кишки человека на эквимоллярные добавки мальтозы и глюкозы: а — мальтозный ответ меньше ответа на глюкозу; б — мальтозный ответ значительно больше ответа на глюкозу

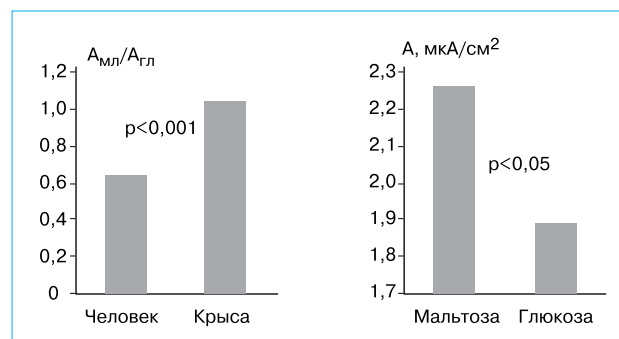


Рис. 6. Ответы ТКЗ на мальтозу ($A_{мл}$) и глюкозу ($A_{гл}$) у человека (справа) и отношение ответа ТКЗ на мальтозу (5 мМ) к ответу на глюкозу (10 мМ) у крысы и человека (слева)

У человека обнаруженная нами у крыс жесткая связь между ответами тока короткого замыкания через стенку тонкой кишки на эквимоллярные добавки мальтозы и глюкозы, характеризующая Na-зависимый транспорт этих сахаров, отсутствует (рис. 5а, 5б, 6). Коэффициент корреляции оказался равным 0,551, уравнение линейной регрессии $A_{гл} = 0,57 + 1,82 \times A_{мл}$.

Обсуждение результатов исследования

Известны два основных механизма взаимодействия мембранного пищеварения и всасывания в желудочно-кишечном тракте. По А.М. Уголеву мембранное пищеварение и последующий транспорт продуктов гидролиза через апикальную мембрану энтероцитов может осуществлять ферментативно-транспортный или гидролизно-транспортный ансамбль (см. рис. 1). Существование такого механизма до сих пор не доказано.

Значительная часть исследователей полагает, что олигомеры питательных веществ (например, мальтоза) сначала гидролизуются мембранными ферментами, образовавшиеся мономеры заполняют некоторый примембранный слой или объем, из которого они затем транспортируются через щеточную кайму энтероцитов тонкой кишки в кровь (см. рис. 2).

Из-за высокой степени корреляции между ответами ТКЗ на глюкозу и мальтозу (0,992) и близости коэффициента пропорциональности между ними к 1 можно сделать вывод о том, что указанный слой должен обладать удивительными «запирающими» свойствами — из него теряется (не доходит до транспортера) не более 5% глюкозы, образовавшейся при расщеплении мальтозы ($A_{\text{гл}} = 0,1 + 1,05 \times A_{\text{мл}}$).

Следует отметить, что ответы ТКЗ вызывает не сама мальтоза, а мальтозная глюкоза. Такой вывод подтверждается как фактическим равенством ответов ТКЗ на эквимоларные добавки глюкозы и мальтозы, так и очевидной связью между величиной ответов на димеры сахаров и скоростью их гидролиза в кишечнике крысы. Действительно, и глюкоза, и галактоза по отдельности стимулируют ТКЗ приблизительно одинаково, а состоящие из них димеры лактоза и целлобиоза в зависимости от скорости их гидролиза увеличивают ТКЗ значительно меньше, чем хорошо гидролизруемая мальтоза. Небольшой эффект целлобиозы возможно обусловлен присутствием в реактиве примеси глюкозы.

В начальный момент времени после добавления нутриента в раствор его поток через непроницаемый слой воды к поверхности энтероцитов за счет диффузии равен $I = D \times (C_0 - 0) / l$, где D — коэффициент диффузии.

У крыс толщина непроницаемого слоя жидкости l равна (табл. 4, [1]): для глюкозы — 310 мкм ($n=18$), для мальтозы — 262 мкм ($n=18$). Объемная концентрация добавленной глюкозы $C_0 = 10$ мМ, мальтозы — 5 мМ. Согласно вышеприведенной формуле, поток мальтозы к поверхности энтероцита равен: $I_{\text{мл}} = 353 \text{ мкм}^2/\text{с} \times 5 \text{ мМ} : 262 \text{ мкм} = 0,673 \cdot 10^{-6} \text{ ммоль}/\text{см}^2/\text{с}$; с учетом быстрого гидролиза мальтозы на две глюкозы скорость появления молекул мальтозной глюкозы у поверх-

ности кишки равна $2 \times 0,67 \cdot 10^{-6} \text{ ммоль}/\text{см}^2/\text{с}$, или $1,347 \cdot 10^{-6} \text{ ммоль}/\text{см}^2/\text{с}$. Поток свободной глюкозы к поверхности кишки $I_{\text{гл}} = 500 \text{ мкм}^2/\text{с} \times 10 \text{ мМ} : 310 \text{ мкм} = 1,61 \cdot 10^{-6} \text{ ммоль}/\text{см}^2/\text{с}$. Следовательно, отношение двух потоков $I_{\text{мл}} : I_{\text{гл}} = 0,84$ ($n=18$).

По мере поступления молекул нутриента (мальтозы или глюкозы) к поверхности энтероцитов начинают функционировать соответствующие Na^+ -зависимые котранспортеры, что регистрируется как увеличение ТКЗ, обусловленного активным транспортом Na^+ . Сравним отношение скоростей появления молекул глюкозы у поверхности энтероцитов — 0,84 с отношением скоростей развития ответов ТКЗ на мальтозу и глюкозу.

Как оказалось (табл. 1, [1]), приблизительно равны не только величины ответов ТКЗ на эквимоларные мальтозу и глюкозу, отношение относительных начальных скоростей развития ответов на мальтозу и глюкозу равно 0,90 ($n=18$).

Если бы молекулы глюкозы, образовавшиеся из мальтозы, могли выходить в окружающий раствор, то для заполнения слоя или объема жидкости, в который они могли бы выходить, требовалось какое-то конечное время. Отношение потоков мальтозы и глюкозы в начальный момент времени (0,84) и отношение относительных начальных скоростей развития ответов (0,90) примерно равны. Иными словами, по мере подхода молекул мальтозы к поверхности энтероцитов они без какой-либо задержки, необходимой для заполнения объема некоего гипотетического примембранного слоя молекулами гидролизованной глюкозы, участвуют в развитии ответа тока короткого замыкания. Либо величина этого объема близка 0, но это и означает передачу мальтозной глюкозы непосредственно на вход транспортера. Следовательно, у крыс Na^+ -зависимый транспорт (всасывание) мальтозы и глюкозы осуществляет один и тот же ферментативно-транспортный механизм.

У человека постановка вопроса о существовании ферментативно-транспортного ансамбля ввиду исходного неравенства последовательных ответов на мальтозу (5 мМ) и глюкозу (10 мМ) не имеет смысла (см. рис. 5).

Выводы

Нами впервые показано, что активный транспорт Na^+ , измеряемый методом ТКЗ, стимулируется в присутствии мальтозы. То есть теперь доказаны необходимые и достаточные условия существования для транспорта мальтозы и натрия в тонкой кишке крысы сопряженного котранспортера.

Na^+ -зависимый транспорт мальтозы и глюкозы осуществляет один и тот же механизм. В щеточной кайме энтероцитов крысы существует ферментативно-транспортный ансамбль, расщеп-

ляющий молекулу мальтозы на две молекулы глюкозы, которые непосредственно передаются на вход в транспортную систему. У человека такой ферментативно-транспортный ансамбль

отсутствует. Свободная и мальтозная глюкоза, по-видимому, транспортируются через щеточную кайму энтероцитов с помощью двух различных механизмов.

Список литературы

1. Метельский С.Т. Влияние возраста на всасывание и мембранное пищеварение в тонкой кишке крыс // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. — 2004. — Т. 90, № 1. — С. 98–105.
2. Метельский С.Т. Транспортные процессы и мембранное пищеварение в слизистой оболочке тонкой кишки. — М.: Анахарсис, 2007. — 271 с.
3. Метельский С.Т., Парфенов А.И., Ручкина И.Н. Изучение всасывания в тонкой кишке больных с синдромом раздраженного кишечника с помощью метода измерения тока короткого замыкания // Эксп. клин. гастроэнтерол. — 2003. — № 1. — С. 160–161.
4. Уголев А.М. Структурная и функциональная интеграция процессов мембранного гидролиза и транспорта (гипотеза «пермеома») // Физиол. журн. СССР им. И.М. Сеченова. — 1977. — Т. 63, № 2. — С. 181–190.
5. Green B.T., Bunett N.W., Kulkarni-Narla F.A. et al. Intestinal Type 2 Proteinase-Activated receptors: Expression in opioid-sensitive secretomotor neural circuit that mediate epithelial ion transport // J. Pharmacol. Exp. Ther. — 2000. — Vol. 295, N 1. — P. 410–416.
6. Hollander D., Dadufaza V.D. Aging: its influence on the unstirred water layer thickness, surface area, and resistance in the unanesthetized rat // Can. J. Physiol. Pharmacol. — 1983. — Vol. 61, N 12. — P. 1501–1508.
7. Kroesen A.J., Stockmann M., Ransco M. et al. Impairment of epithelial transport but not barrier function in idiopathic pouchitis after ulcerative colitis // Gut. — 2002. — Vol. 50, N 6. — P. 821–826.
8. Ugolev A.M. Influence of the surface of the small intestine on enzymatic hydrolysis of starch by enzymes // Nature. — 1960. — Vol. 188. — P. 588–589.
9. Ugolev A.M. Membrane digestion. New facts and concepts / Ed. A.M. Ugolev. — M.: MIR Publishers, 1989. — 288 p.

Работа поддержана грантом РФФИ 09-04-01698