

дочного сока больных желездефицитной анемией [112]. В эксперименте на собаках желудочный сок анемизированных животных повышал всасывание железа у контрольных почти в 2 раза [96].

Мюррей [121] в желудочном секрете обнаружил термолабильную субстанцию, способную стимулировать всасывание железа у гастрэктомированных крыс. Ваксман и соавт. [160, 161] показали в опытах *in vitro* существование в препаратах внутреннего фактора — гастромукопротеина, способного прочно комплексоваться с гемом. Всасывание гемоглобинового железа при исследовании *in vivo* увеличивалось у больных пернициозной анемией в период ремиссии под влиянием нейтрализованного желудочного сока, лишённого ферментативной активности. Полученный при еюнальном зондировании аспират от больных циррозом печени оказался способным повысить всасывание железа. Пирсио-Бироли [127] путем интрадуоденального введения желудочного сока крыс, перегруженных железом, добился угнетения его всасывания у здоровых крыс-реципиентов.

Однако некоторым исследователям не удалось доказать стимулирующую роль желудочного секрета во всасывании железа [58]. Компенсация дефицита железа повышением всасывания требует полной сохранности функции желудочно-кишечного тракта, и в частности функции желудка. Это положение подробно исследовано в различных клинических ситуациях [7, 10, 11, 13] (табл. 5.3).

Таблица 5.3

Всасывание ^{59}Fe из его закисной соли (FeCl_2) с добавлением 150 г белого хлеба

Обследованные	Число обследованных	Всасывание железа, %
Здоровые	26	8.3±1.1
Больные желездефицитной анемией:		
без поражения слизистой оболочки желудка . .	13	44.7±1.8
с атрофическим гастритом	36	20.2±0.9
Больные с атрофическим гастритом без анемии . .	22	7.1±1.5
Больные после резекции желудка:		
с дефицитом железа	17	15.8±7.2
без дефицита железа	18	8.9±4.1

Из данных таблицы следует, что сохранение желудочной секреции является важным, но не определяющим условием компенсации дефицита железа. Действительно, хотя в группах больных с ахилией всасывание железа при его дефиците и повышается, оно все же не достигает величин, наблюдающихся у лиц с непо-

врежденным желудком. Можно предположить, что желудочное пищеварение способствует у больных с поврежденным желудком лучшему комплексованию железа и поступлению его в кишечник в форме, более выгодной для всасывания. Наиболее вероятным является лучшее комплексование железа с гликопротеином желудочной слизи.

Всасывание гемоглобинового железа повышается при дефиците железа в меньшей степени [163]. В исследовании Гурвича и Малиновской [4] показано активное всасывание гемоглобина у здоровых людей (114.7%). По-видимому, гем захватывается легче и активнее эпителиальными клетками кишечника здоровых людей. В условиях формирования различных форм желездефицитных состояний абсорбция гемоглобинового железа повышается, но в меньшей степени, чем неорганического железа. Существенно, что почти у 50% больных желездефицитной анемией абсорбция железа не отличается от нормы. Аналогичные результаты были получены Каллендером [39]. Однако Уэйби [166] в экспериментах на крысах показал 20-кратное увеличение всасывания гемоглобина при дефиците железа.

Характер влияния секрета поджелудочной железы на всасывание железа окончательно не установлен. С одной стороны, существуют исследования, доказывающие торможение всасывания железа поджелудочной железой. Так, панкреатэктомия, хронический панкреатит, перевязка вирсунгова протока увеличивают всасывание железа [54, 93, 95, 149]. Однако подавление всасывания введенным экстрактом поджелудочной железы добровольцам не обнаружено [94]. Трипсин хорошо комплексуется железом [148]. Сомнительны результаты исследования всасывания при хронических панкреатитах [20, 53, 57]. Несомненно, более экспериментально обосновано все же представление о торможении всасывания железа панкреатическим соком. Возможно, это связано с ощелачивающим его действием или разрушением благодаря трипсическому перевариванию комплексов железа с пептидами. Нет убедительных данных в пользу какого бы то ни было влияния желчи на всасывание железа [167].

Итак, внутриполостное пищеварение подготавливает соединения железа из пищи к всасыванию в двенадцатиперстной кишке: разрушаются непрочные соединения железа (трехвалентное железо восстанавливается до двухвалентного), образуются прочные комплексные низкомолекулярные соединения железа.

5.6. МЕХАНИЗМ ВСАСЫВАНИЯ ЖЕЛЕЗА

Всасывание железа осуществляется биохимической системой транспорта железа через эпителиальную клетку — свою систему «железной помпы» [105, 123, 125, 139]. Значительные разногласия, долгое время существовавшие по этому вопросу, были связаны с тем, что в ряде экспериментов не удавалось пол-

ностью подавить транспорт железа эпителиальными клетками кишки высокими дозами цианидов и азидов, выключающими транспорт натрия [135].

Следует отметить, что железо вводилось в кишечник в высоких дозах. Между тем соли железа токсичны и вызывают некроз слизистой оболочки тонкой кишки. В физиологических условиях железо поступает в кишечник, как правило, в форме комплексных соединений. Очевидно, при введении в кишку высоких концентраций солей железа развивается пассивная диффузия железа, обусловленная некрозом эпителия кишки. Этот вывод подкрепляется исследованиями зависимости всасывания железа от дозы [21, 67].

Результаты их указывают на существование двух кинетически различных процессов во всасывании железа, из которых первый характеризуется особенностями, указывающими на наличие носителя железа в стенке кишки, количество которого лимитирует всасывание. Кинетика второго процесса — простая диффузия (кинетика первого порядка). Явления пассивной диффузии развиваются при высоких дозах солей железа.

Всасывание железа протекает в два этапа: захват железа стеной кишки и транспорт железа через эпителиальную клетку. Многочисленные доказательства раздельности этих двух процессов представлены в работах, выполненных при электронномикроскопических исследованиях [48, 49, 51].

I этап всасывания — абсорбция железа — определяется гликокаликсом и мембраной эпителиоцита [62, 72, 118]. Оказалось, что абсорбция железа не эквивалентна простой физической сорбции — действительно, захваченное гликокаликсом железо не отмывается ЭДТА и десфералом. Альбот [16] с помощью еюнального зондирования установил, что через час после введения железа в тонкую кишку оно лишь наполовину определяется в промывных водах. Дати и соавт. [61] показали, что захват железа исчерпанной каемкой эпителиоцита заканчивается между 15-й и 30-й минутами после введения раствора железа в кишку. То же показали Манис и Шехтер [105]. Бедард и Пинкертон [23] установили с помощью электронной автордиографии, что фиксация железа в исчерпанной каемке и апикальной цитоплазме эпителиоцита достигает максимума к 30-й минуте, снижается вдвое к 90-й и до нуля к 180-й минуте после введения железа в кишку. Процесс захвата железа исчерпанной каемкой эпителиоцита требует энергии, не чувствителен к недостатку кислорода и слабо тормозится цианидом [72, 138].

Однако торможение синтеза белка на уровне трансляции в кишечных эпителиоцитах циклогексимидом приводило к значительному снижению захвата железа исчерпанной каемкой [72, 151, 153]. Муерджи [118] показал, что железо фиксируется гликокаликсом и исчерпанной каемкой неравномерно: отдельные

клетки, группы клеток активно захватывают коллоидное железо, другие остаются совершенно «пустыми».

Захват железа исчерпанной каемкой пропорционален концентрации железа в просвете кишки и различен в зависимости от лигандов железного комплекса. Показано влияние на адсорбцию температуры и (менее достоверно) pH содержимого кишки. Однако не обнаружено зависимости адсорбции железа от валентности и от молекулярного веса адсорбирующегося комплекса железа [72, 151]. По-видимому, в кишечном эпителиоците в процессе адсорбции комплексов железа синтезируется гликопротеин, способный прочно и специфически захватывать комплексы железа с образованием нового крупномолекулярного соединения. Исследования конкуренции всасывания железа с кобальтом [153, 154], магнием и особенно кадмием [79] позволило установить, что конкуренция осуществляется на стадии сорбции железа исчерпанной каемкой эпителиоцитов. Следовательно, захват этих металлов исчерпанной каемкой осуществляется одним биохимическим механизмом ограниченной емкости. Допустимо предположение о существовании специфического мембранного носителя, скорость синтеза которого лимитирует транспорт железа.

Поиски специфического носителя железа в кишечном эпителиоците предприняты в последние годы многими группами исследователей [85, 92, 125, 128, 169]. Обнаружены вещества, которые характеризуются как негеминные неферритиновые растворимые металлопротеиновые гидрофильные комплексы разного молекулярного веса [31, 122, 168]. Их отношение к пространственной структуре эритроцита не выяснено. Лишь недавнее исследование Иошино [92] доказало существование связанного с мембраной эритроцита гликопротеина, специфически захватывающего железо.

II этап всасывания железа — транспорт его кишечным эпителиоцитом в кровь — изучен недостаточно. Из апикальной части цитоплазмы кишечного эпителиоцита железо распространяется в области клетки, богатые эндоплазматическим ретикуломом и захватывается свободными рибосомами [23]. Борвуд и Джекобс [170] методом дифференциального центрифугирования в градиенте сахарозы обнаружили захват всасывающегося железа ядром и митохондриями кишечного эпителиоцита. Однако результаты их исследований подвергаются сомнению. Большие данные в пользу включения железа микросомальной фракцией [23].

Получены доказательства существования в кишечном эпителиоците растворимого низкомолекулярного мукопротеина (отличного от мембранного), транспортирующего железо [28, 34, 35]. Далее железо или фиксируется в эндоплазматическом ретикулуме, где происходит частично синтез ферритина, или транспортируется через базальную мембрану клетки в кровь. Возможен транспорт и через латеральную мембрану в межклеточное пространство [23, 24]. Механизм транспорта железа через базальную мембрану неизвестен.

Транспорт железа через кишечный эпителиоцит — энергетически зависимый процесс, редко подавляется цианидом, азидом, значительно отличается в различных отделах кишечника. Транспорт железа кишечным эпителиоцитом зависит от состояния обмена железа: при дефиците железа транспорт растет, при избытке — падает.

Среди веществ, образующихся в кишечном эпителиоците при всасывании железа, ранее других был обнаружен ферритин, и до настоящего времени это единственный точно идентифицированный металлопротеин кишечной клетки. Накопление ферритина при всасывании железа, обнаруженное Гранником [68, 70], было подтверждено всеми последующими исследованиями [41]. Однако показано, что образование ферритина — так сказать, «боковой» путь железа в клетке; при повышении транспорта железа ферритин практически не образуется. Содержание железа в клетке определяет скорость синтеза ферритина кишечным эпителиоцитом [52, 92, 143]. Судьба комплексов железа в процессе всасывания вызывает серьезные разногласия. Господствовало мнение о разрушении комплексов на мембране и о «передаче» железа мембранным носителем протоплазматическому белку.

Однако оказалось, что многие комплексы железа всасываются целиком, без разрушения молекулы. К ним относятся гем [158], овоглобулин, комплекс железа с ЭДТА, ферритин. Все эти вещества обнаружены в воротной вене при нагрузке мечеными пищевыми продуктами. Однако большая часть комплексов железа несомненно разрушается в процессе всасывания. У животных разных видов отношение всасывания комплексных соединений железа к разрушению комплекса различно [45, 47]. Терато и соавт. [150, 151], используя искусственные комплексы железа разного молекулярного веса, показали, что всасываются исключительно комплексы железа с молекулярным весом $< 10\,000$ [151]. Возможно, крупномолекулярные комплексы всасываются путем эндоцитоза [80]. Достаточно исследована судьба гема в процессе всасывания. Часть молекул гема транспортируется кишечным эпителиоцитом в кровь без освобождения железа (до 30% [18, 39, 40]). Большая часть разрушается с освобождением железа, которое захватывается носителем, и билирубина, всасывающегося в воротную вену. Вайнтрауб и соавт. [163] считали вероятным разрушение гема перекисью водорода, образованной при окислении ксантина в мочевую кислоту. Перекись водорода способствует расщеплению метановых углеродных мостиков ферропротопорфирина. Ключевым ферментом для этой реакции служит ксантин-оксидаза. Однако попытка подавить всасывание гемоглобина применением специфического антифермента оказалась неудачной [56].

Более обоснована точка зрения, что гем разрушается в кишечном эпителиоците специфической микросомальной гемоксигеназой

с образованием гема IX-а билирубина, СО и иона железа при участии НАДФН [131]. Активность гемоксидазы зависит от интенсивности всасывания железа. Доказана субстратная индукция гемоксидазы гемом.

Все всосавшееся железо попадает в кровь воротной вены. Роль лимфы в транспорте железа от кишечника ничтожна [144]. Железо в крови захватывается сидерофилином, низкомолекулярные комплексы железа целиком элиминированы из кровотока печенью. Железо в комплексе с сидерофилином, не захватываясь печенью, включается в фонд железа плазмы.

5.7. РЕГУЛЯЦИЯ ВСАСЫВАНИЯ ЖЕЛЕЗА

Как указывалось выше, всасывание железа является основным физиологическим процессом в поддержании «железного гомеостаза». Действительно, организм теплокровного животного не способен компенсировать перегрузку железом повышением его выведения.

Существование тонкого механизма регуляции, удивительно точно поддерживающего равновесие организма со средой, несмотря на меняющиеся потребности и резко различные количество и качество поступающих соединений железа, прочно доказано.

Дефицит железа в организме приводит к увеличению всасывания солей железа [1, 64, 83]. Это явление настолько закономерно, что привело к разработке метода диагностики дефицита железа у людей, основанного на исследовании всасывания солей железа [83].

Всасывание железа повышается не только при развитой железодефицитной анемии. Уже в ранних стадиях дефицита, когда он ограничивается лишь уменьшением запасов железа (скрытый дефицит железа), всасывание заметно повышается [7, 12, 47, 84, 85]. Можно считать установленным, что всасывание «настроено» на общее содержание железа в организме.

Повышение всасывания пищевого железа при его дефиците менее выражено по сравнению с солями железа. Всасывание железа из хлеба составило 4,9% у здоровых и соответственно 7,4 и 17,1% при скрытом дефиците железа и развитой анемии [7, 12]. Всасывание гемоглобинового железа при дефиците железа возрастает в 1,5 раза [4, 42, 103, 163], т. е. заметно меньше, чем всасывание железа из растительной пищи. К интерпретации этого факта мы обратимся ниже.

Перегрузка железом приводит к падению всасывания железа, пропорциональному величине избытка железа [29]. Изящные исследования, выполненные методом Вильсона, доказали основное для понимания всасывания железа положение: регуляция всасывания целиком определяется меняющимися транспортными свойствами кишечного эпителиоцита. Транспорт железа кусочком двенадцатиперстной кишки, взятым от животного с дефици-

том железа, был в несколько раз выше, чем транспорт нормальной кишкой. Увеличивалась не только общая величина транспорта, но и его скорость, особенно ранняя составляющая ее [59, 73].

Для понимания регуляции всасывания железа существует факт подавления всасывания железа при его повторном введении в кишечник [76].

Хан и соавт. [76], а позднее Граник [68—70] предложили гипотезу регуляции всасывания железа, известную как «гипотеза блокады слизистой оболочки кишки». Основное значение эта гипотеза придает состоянию в кишечном эпителиоците акцепторной системы апоферритин—ферритин. Всасывающееся железо, соединяясь с апоферритином, образует ферритин. Полное насыщение апоферритина прекращает всасывание. Скорость транспорта железа из кишечных эпителиоцитов в кровь много ниже скорости образования ферритина. При дефиците железа в кишечном эпителиоците существует преимущественно апоферритин, при избытке — ферритин. Гипотеза «блокады слизистой» встретила серьезные возражения, главным из них было существование и преобладающее значение в транспорте железа кишечным эпителиоцитом неферритиновых низкомолекулярных соединений железа.

В 1963 г. Кросби [48] выдвинул новую теорию регуляции всасывания железа. В основу ее легли цитированные выше исследования о двух этапах всасывания железа. Кросби предположил, что содержание железа в кишечном эпителиоците зависит от общей тенденции обмена железа. При избытке железа оно откладывается в клетке (см. схему интермедиарного обмена железа); при недостатке — покидает эпителиоцит, включаясь в обмен. Запас железа в кишечном эпителиоците закладывается преимущественно при образовании клетки в крипте кишки. Слущивающиеся с вершины ворсинки кишечные эпителиоциты и макрофаги (выселяющиеся в просвет кишечника) [117] уносят много железа при его избытке и лишь незначительные количества — при дефиците. Новым в теории Кросби является положение о зависимости окончательной величины всасывания железа от потери уже захваченного кишечным эпителиоцитом железа при экстрюзии клеток эпителия тонкой кишки.

Теория Кросби серьезно экспериментально аргументирована. Доказано выделение кишечником введенного внутривенно радиоактивного железа с периодом, соизмеримым с периодом обновления клеток кишечного эпителия. Методом автордиографии документировано отложение железа при внутривенном введении ^{59}Fe в кишечные эпителиоциты, преимущественно в области кишечной крипты, с последующим продвижением зоны радиоактивности к верхушке ворсинки [48, 51]. Оказалось, что содержание гемиевого железа в эпителии тонкой кишки коррелирует со всасыванием железа [107].

Общим для теорий Граника и Кросби является положение, что абсорбционная способность кишечного эпителиоцита определяется содержанием в нем железа. Последнее соответствует состоянию кинетики железа в момент образования клетки. Между тем из предыдущего изложения известно, что транспорт железа — активный процесс большой мощности. Транспорт увеличивается в первые часы всасывания железа, т. е. в зависимости от потребности в железе меняется скорость транспорта. Если принять, следуя Кросби, что всасывание железа определяется содержанием железа в клетке, остается неясным, как содержание железа влияет на скорость его транспорта. Напомним в связи с этим, что в процессе транспорта железа, по-видимому, синтезируется белок-переносчик. Далее, при скрытом дефиците железа всасывание повышено, однако кинетика железа при этом состоянии не изменена [12, 66]; при гемосидерозе кровопускания, снижая величину железа плазмы, не увеличивают всасывание железа [44]. Наконец, несмотря на то что кинетика железа целиком определяется активностью эритропоэза, было показано существование повышенного всасывания железа при подавлении эритропоэза (см. ниже).

Чтобы избежать этих противоречий, Кросби вводит представление о «гомеостатической функции сидерофилина». Соотношение белок—железо, т. е. насыщение сидерофилина железом, он рассматривает как основной регулятор направления железа — из кишечного эпителиоцита в кровь, из крови в кишечный эпителиоцит. Это представление ранее выдвигалось Хальбергом [78]. Было показано, что при непрерывном интрадуоденальном введении железа его всасывание растет до тех пор, пока сидерофинин не будет полностью насыщен, в дальнейшем всасывание снижается в 5 раз. В то же время внутривенное введение свободного сидерофилина резко повышало всасывание железа [78].

Высокую корреляцию всасывания железа и уровня сидерофилина в крови установили Хайд и соавт. [86] на крысах, увеличивая концентрацию сидерофилина на 300% от исходной. Он повышал всасывание железа на 50%. Аналогичные работы выполнили на кроликах Чарли и соавт. [43], Тэйлор и Гатенби [149]. Рымс и соавт. [10, 11] обнаружили корреляцию всасывания железа и уровня сидерофилина. Однако Гейльмейер [82] представил клиническое наблюдение, противоречащее излагаемой концепции. Описана девочка 3 лет, страдающая врожденной полной сидерофилинемией. Кровь ребенка содержала только следы железа, однако всасывание железа было повышенным. Использование для определения всасывания метода измерения γ -излучения всего тела не подтвердило результатов исследования Хальберга [98, 99].

Взаимотношения уровня сидерофилина в крови и всасывания железа изучались Уэби [164]. Оказалось, что при полном насыщении сидерофилина железом всасывание железа продолжается,

но оно целиком захватывается печенью. Захват печенью железа начинается при насыщении сидерофилина железом на 75%. При полном насыщении сидерофилина печень захватывала 99% всосавшегося железа против 20% в контроле. Установлена разница содержания железа в воротной и нижней полой венах в процессе всасывания железа. Следовательно, печень обладает способностью полностью захватывать железо, всасывающееся в избытке (сверх железосвязывающей способности сидерофилина).

Как указывалось выше, в условиях нагрузки сидерофилина железом оно может захватываться гепатоцитом в комплексе с аминокислотами [129]. Следовательно, предположение Кросби о гомеостатизирующей обмен железа функции сидерофилина не оправдано.

Итак, выделение железа случивающимися эпителиальными клетками кишки несомненно существует, и в этой части теория Кросби не вызывает возражений. Однако механизм увеличения и уменьшения транспорта железа кишечными эпителиоцитами она не объясняет. Не решает теория Кросби и главную проблему регуляции всасывания железа — путь передачи информации кишечному эпителиоциту о состоянии обмена железа.

Существенную дополнительную информацию о механизме регуляции всасывания железа дали исследования генетических аномалий обмена железа — гемохроматоза у людей и железодефицитной анемии ливейных мышей. При гемохроматозе — наследственной патологии обмена железа — всасывание железа повышается и приводит организм больного к резкой перегрузке железом [30]. По-видимому, механизм обратной связи: запас железа — кишечный эпителиоцит — при этом заболевании выключен. При анемии ливейных мышей существует обратная ситуация: несмотря на тяжелый дефицит железа, оно практически не всасывается.

Пинкертон [125], основываясь на этих наблюдениях и результатах исследования цитоплазматического переносчика железа в кишечном эпителиоците, выдвинул новую теорию регуляции всасывания железа. Он считает, что при образовании эпителиоцита в кишечной кишке происходит синтез переносчика железа в зависимости от состояния обмена железа.

При дефиците железа, таким образом, функционирует популяция кишечных эпителиоцитов с высокой активностью переносчика — высокой скоростью транспорта железа. Поэтому случивающиеся клетки практически железа не содержат. При избытке железа активность переносчика мала, железо фиксируется в кишечных эпителиоцитах.

Таким образом, всасывание определяется структурой популяции кишечного эпителиоцита. Железо, по-видимому, вызывает репрессию гена, ответственного за синтез белка — переносчика железа в клетке. Несмотря на недостаточные экспериментальные основания, гипотеза Пинкертона представляется весьма перспек-

тивной. Действительно, изменение темпа пролиферации кишечных эпителиоцитов резко снижает всасывание железа (лихорадка, рентгеновское облучение, белковое голодание, энтерит) [30, 60, 110, 114].

Возможно, этот механизм объясняет и изменения всасывания железа при гипоксии. Повышение всасывания железа при гипоксии обнаружено как в эксперименте [81, 159], так и в исследованиях высотной гипоксии у добровольцев [133, 134] и альпинистов [2]. Оказалось, что гипоксия стимулирует всасывание железа независимо от активности эритропоэза, т. е. кинетики железа. Так, в исследованиях Строймайера и Менделя [110, 146], а в последнее время Пешла [124] показано, что подавление эритропоэза рентгеновским облучением и антиэритропоэтической спиронозой не уменьшало всасывания железа при гипоксии. Неэффективной оказалась также попытка подавить гипоксическую стимуляцию всасывания железа искусственным переполнением его запасов [111]. Введение эритропоэтина не меняет всасывания железа [124].

Механизм влияния гипоксии на всасывание железа неизвестен. Попытки обнаружить гуморальный посредник [33, 97] оказались неудачными. Исследователи приходят к заключению, что эффект гипоксии определяется изменениями в эпителии слизистой оболочки кишки. Предположение о существовании гуморального фактора регуляции всасывания железа не подтвердилось и для постгеморрагической анемии, полицитемии, переполнения запасов железа [25, 37, 65, 133, 134]. Отдельные положительные результаты [17, 109] требуют тщательной проверки.

В заключение следует еще раз отметить своеобразие всасывания железа, единственного процесса регуляции постоянства содержания этого элемента в организме высших животных. Всасывание железа точно приспособливается к потребностям организма в каждый момент его развития. Другой особенностью всасывания железа является его высокая зависимость от формы поступления железа в желудочно-кишечный тракт. У животных, относящихся к различным отрядам — хищных, травоядных и т. д., всасывание железа значительно различается. Механизмы этого замечательного приспособления до настоящего времени не могут считаться полностью выясненными. Однако анализ многочисленных экспериментальных данных свидетельствует о важном значении кишечного эпителиоцита в регулировании всасывания железа.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бродович Л. А. Обмен железа при анемических состояниях. Негемоглобиное железо плазмы при заболеваниях красной крови. — Клиническая медицина, 1948, т. 28, № 1, с. 66—76.
2. Вельчко А. Г. Некоторые механизмы влияния гипоксии на эритропоэз у альпинистов. Автореф. канд. дис. Л., 1970.

149. Taylor M. R., Gatenby P. B. B. Iron absorption in relation to transferrin saturation and other factors. — Brit. J. Haematol., 1966, v. 12, № 4, p. 147—153.
150. Terato B. S., Joshiko Hiramatsu B. S., Joshino M. D. Studies on iron absorption. — Dig. Dis., 1973, v. 18, № 2, p. 129—134.
151. Terato B. S., Takeshi Fujira Ph. D., Joshio Joshino M. D. Studies on iron absorption. — Dig. Dis., 1973, v. 18, № 2, p. 121—128.
152. Thomas F. B., McCullough F. S., Greenberg N. J. Effect of phenobarbital on the absorption of inorganic and hemoglobin iron in the rat. — Gastroenterol., 1972, v. 62, № 4, p. 590—599.
153. Thomson A. B., Walberg L. S. A common intestinal carries mechanism for iron and cobalt. — Gastroenterol., 1970, v. 58, № 6, 1001—1005.
154. Thomson A. B., Walberg L. S., Singlair D. G. Competitive nature of the intestinal transport mechanism for cobalt and iron in the rat. — J. Clin. Invest., 1971, v. 50, № 10, p. 2384—2394.
155. Turnbull L. A. The absorption of iron after partial gastrectomy. — Quart. J. Med., 1966, v. 35, № 137, p. 107—118.
156. Turnbull L. A. Gastric factor in iron absorption. — Lancet, 1968, v. 1, № 7548, p. 921.
157. Turnbull A. The absorption of radioiron given with a standard meal after partial gastrectomy. — Clin. Sci., 1965, v. 28, № 3, p. 499—509.
158. Turnbull A., Cleton F., Finch C. A. Iron absorption. IV. The absorption of hemoglobin iron. — J. Clin. Invest., 1962, v. 42, № 8, p. 1897.
159. Vassar P. S., Taylor D. M. Effects of hypoxia on iron absorption in rats. — Proc. Soc. Exptl. Biol. a. Med., 1956, v. 93, p. 504—506.
160. Waxman S., Pratt P., Herbert V. Further evidence for presence in normal but not in pernicious anemia gastric juice of an «intrinsic factor» for absorption of iron in hemoglobin. — Clin. Res., 1967, v. 15, p. 245.
161. Waxman S., Pratt P., Herbert H. Melabsorption of hemoglobin iron in pernicious anemia. Correction with «intrinsic factor» containing substances. — J. Clin. Invest., 1968, v. 47, № 8, p. 1819—1825.
162. Webb J., Multani P. S., Saltman P., Gray H. B. Spectroscopic and magnetic studies of iron gastroferrin. — Biochemistry, 1973, v. 12, № 2, p. 265—267.
163. Weintraub L. R., Weinstein M. B., Huser I. J., Rajal S. Absorption of hemoglobin iron. The role of hemesplanning substance in the intestinal mucosa. — J. Clin. Invest., 1968, v. 47, № 4, p. 531—538.
164. Wheby M. S., Crosby W. H. The gastrointestinal tract and iron absorption. — Blood, 1963, v. 22, № 3, 416—428.
165. Wheby M. S., Jones L. G. The gastrointestinal tract and iron absorption. — J. Clin. Invest., 1963, v. 42, № 6, p. 1007—1011.
166. Wheby M. S., Jones L. G., Crosby W. H. Studies on iron absorption. Intestinal regulatory mechanisms. — J. Clin. Invest., 1964, v. 43, № 7, p. 1433—1442.
167. Wheby M. S., Suttle G. F., Ford K. T. Intestinal absorption of hemoglobin iron. — Gastroenterol., 1970, v. 58, p. 647.
168. Worwood M., Edwards A., Jacobs A. Non-ferritin iron compound in rat and small intestinal mucosa during iron absorption. Nature (London), 1971, v. 229, № 5284, p. 409—410.
169. Worwood M., Jacobs A. Absorption of Fe⁵⁹ in the rat: iron binding substance in the soluble fraction of intestinal mucosa. — Life Sci., 1971, v. 10, № 1, p. 1363—1364.
170. Worwood M., Jacobs A. The subcellular distribution of orally administered Fe⁵⁹ in rat small intestinal mucosa. — Brit. J. Haematol., 1971, v. 20, № 6, p. 587—597.
171. Worwood M., Jacobs A. The subcellular distribution of Fe⁵⁹ in small intestinal mucosa: studies with normal, iron deficient and iron overloaded rats. — Brit. J. Haematol., 1972, v. 22, № 3, p. 265—272.

Глава 6

ВСАСЫВАНИЕ САХАРОВ

И. И. Никольский

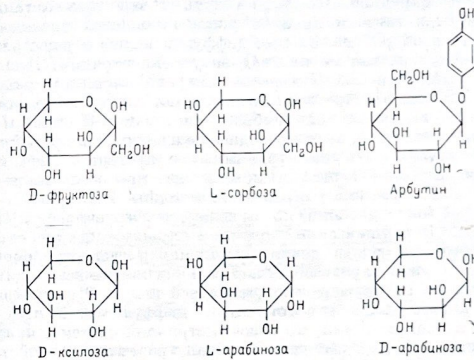
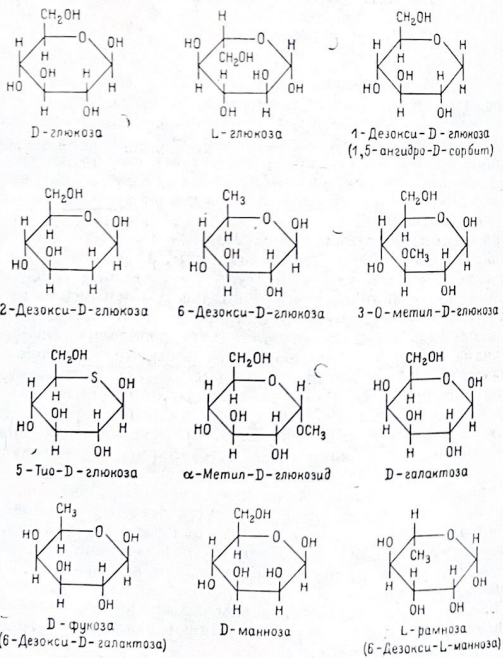
В кишечнике млекопитающих может всасываться большая группа сахаров. В природных условиях основным из них является глюкоза, поэтому почти все экспериментальные исследования направлены на изучение механизма всасывания глюкозы. На второе по значимости место следует отнести фруктозу. Этому сахару, однако, посвящено мало исследований. И, наконец, в период питания организма молоком матери существенное значение имеет галактоза.

При анализе механизма всасывания речь будет идти только о моносахаридах, потому что дисахариды, а тем более полисахариды не всасываются и могут поступать в кровь или лимфу только в крайне малых количествах за счет диффузии. Следует подчеркнуть, что под всасыванием в настоящей главе подразумевается только процесс переноса вещества через эпителиальные клетки кишечника и не рассматриваются процессы, протекающие на поверхности кишечного эпителиоцита (см. гл. 11). Поскольку мембранный гидролиз ди- и полисахаридов протекает на клеточной поверхности, правильнее было бы говорить о нескольких этапах всасывания: мембранном гидролизе, транспорте через апикальную мембрану, транспорте через латеральную и базальную мембраны кишечного эпителиоцита и переносе вещества через слой подслизистой оболочки. Основные процессы, обеспечивающие специфичность и активный характер всасывания, протекают в апикальной мембране клетки. На поверхности этой мембраны локализованы и процессы мембранного пищеварения. И поскольку в природных условиях организм имеет дело, как правило, с олиго- и полисахаридами, то в действительности осуществляется единый процесс, названный Уголевым пищеварительно-транспортным конвейером (см. гл. 11). В настоящей главе рассматривается транспорт моносахаридов.

6.1. КРАТКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МОНОСАХАРИДОВ

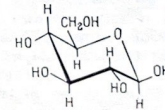
Глюкоза, фруктоза и в значительно меньшей степени галактоза являются утилизируемыми сахарами. При исследовании их всасывания необходимо учитывать как уровень их метаболизма тканями кишечника, так и влияние их метаболизма на другие, в том числе транспортные, процессы. Поэтому для изучения механизма всасывания удобнее применять неметаболизируемые сахара. Сопоставляя абсорбцию различных сахаров, можно вычлени в молекуле глюкозы группы, наиболее существенные для обеспечения транспорта, и тем самым подойти к пониманию механизма взаимодействия молекул сахара с мембраной.

Ниже приведены формулы различных сахаров и шестиатомных спиртов, наиболее часто применяемых в опытах:



Все сахара приведены в пиранозной форме, в виде β-аномеров. Как правило, в растворе сахара присутствуют в основном в пиранозной форме, хотя ее процентное содержание может варьировать [3]. Некоторое количество сахара (например, 15% D-фруктозы) находится в фуранозной форме, и совсем незначительная

Рис. 6.1. Конформация молекулы β-D-глюкозы в форме «кресла C1».



доля приходится на альдегидную, или кетоформу. Процентное содержание в растворе α- и β-аномеров различно для разных сахаров. Так, содержание α-формы составляет в растворе D-рибозы 16%, D-глюкозы — 36%, L-арабинозы — 74%. Пиранозное кольцо может принимать в растворе несколько различных конформаций. D-глюкоза и близкие к ней по транспортным свойствам сахара присутствуют в растворе в основном в конформации «кресло C1» (рис. 6.1). D-фруктоза и L-сорбоза находятся в растворе в конформации 1C.

6.2. ПУТИ ПЕРЕНОСА САХАРОВ

Если вещество поступает из просвета кишечника в кровь или лимфу, то в принципе возможны несколько путей переноса: диффузия, конвекционный (осмотический) поток, специфический транспорт (пассивный или активный), пиноцитоз с по-

следующей секрецией. Последний путь у взрослых организмов не играет практически никакой роли, на первых трех следует остановиться подробнее. За счет диффузии может осуществляться перенос вещества только по градиенту концентрации. Для обеспечения диффузии сахаров необходимо наличие пор радиусом более 0,4 нм [4, 5]. При этом безразлично, где локализованы такие поры — в апикальной мембране клетки или в области межклеточных контактов, хотя последнее более вероятно. Диффузионный путь должен быть симметричным, т. е. при одинаковом градиенте концентрации вещества потоки из просвета кишечника в кровь и в обратном направлении должны быть равны. Конвекционный (осмотический) поток вещества обеспечивается за счет тока воды. Движущей силой при этом служит осмотический градиент, гидростатическое давление или механическое перемешивание. В последнем случае облегчается поступление вещества к поверхности, но не перенос вещества через ткань. В симметричной системе конвекционный поток, как и диффузионный, не должен зависеть от направления, но в асимметричной системе, например состоящей из последовательных мембран с различными свойствами, поток становится асимметричным. Зависимость величины потока от направления может обуславливаться также изменением свойств системы, например расширением или замыканием межклеточных щелей. Как и в случае диффузии, для переноса сахара конвекционным путем необходимо наличие пор с радиусом более 0,4 нм. В отличие от диффузии конвекционный поток может обеспечивать поток вещества против градиента концентрации.

Наконец, специфический транспортный путь предполагает наличие особой системы, осуществляющей перенос вещества через клетку либо до выравнивания концентраций (пассивный транспорт), либо с обеспечением его аккумуляции (активный транспорт). Наибольшее значение в процессе всасывания глюкозы имеет активный транспорт. Так, в опытах на собаках в условиях *in situ* было показано, что при перфузии петли кишки раствором Кребса с глюкозой соотношение диффузионного, конвекционного и активного компонентов в переносе глюкозы составляет 1 : 2 : 10 [99]. В экспериментальных условиях *in vitro* диффузионный и особенно конвекционный потоки могут быть и ниже. Поэтому, измеряя перенос сахара через стенку кишечника или поступление сахара в слой эпителиальных клеток, в большинстве случаев можно считать, что исследуется активный транспорт.

6.3. ХАРАКТЕРНЫЕ ЧЕРТЫ ТРАНСПОРТА САХАРОВ В ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ КИШЕЧНИКА

Глюкоза может всасываться из просвета кишечника в кровь против градиента концентрации. В опытах *in vivo* и *in vitro* способность транспортироваться против градиента концентрации была показана для большой группы сахаров и глюко-

зидов. Транспортируются против градиента концентрации и аккумулируются в эпителиальных клетках с высоким коэффициентом распределения следующие сахара и глюкозиды: D-глюкоза, 6-дезоксид-глюкоза, 3-дезоксид-глюкоза, 1-дезоксид-глюкоза, 3-О-метил-D-глюкоза, 5-тио-D-глюкоза, D-галактоза, α - и β -метил-глюкозиды, арбутин, хелицин и другие глюкозиды [20, 43, 44, 51, 95, 148]. В гораздо меньшей степени и только при низких концентрациях аккумулируются L-глюкоза и D-ксилоза [16, 26, 58, 96, 112]. Активно не транспортируются и не аккумулируются 2-дезоксид-глюкоза, 5-дезоксид-глюкоза, D-арабиноза, L-рамноза, L-манноза, L-фукоза, D-рибоза, D-ликсоза [26, 45, 80, 95, 130, 148]. Не транспортируется и используется для определения внеклеточного пространства шестиатомный спирт — маннит [27]. Но циклический шестиатомный спирт — инозит транспортируется активно, вероятно иной системой, чем сахара [36]. Поступают в клетки и быстро метаболизируются фруктоза и D-манноза. Однако вопрос о характере их транспорта пока остается открытым.

Транспорт сахара из просвета кишечника в кровь против градиента концентрации обеспечивается за счет способности кишечных эпителиоцитов аккумулировать сахара. Дальнейший путь из этих клеток в кровеносное русло идет по градиенту концентрации. Локализация аккумулирующего механизма в эпителиальных клетках слизистой оболочки тонкой кишки была доказана путем анализа сахара в последовательных срезах замороженной стенки кишечника [104] и методом автордиографии [92, 139]. Внутриклеточного градиента сахара не обнаружено. При внесении сахара с базальной или серозной стороны наблюдался лишь очень незначительный вход сахара в эпителиальные клетки слизистой оболочки тонкой кишки. Удобный и простой экспериментальный прием для исследования аккумуляции сахара в клетках слизистой оболочки был предложен Уголевым и соавт. [11]. Прямые доказательства аккумуляции сахаров кишечными эпителиоцитами с исчерченной каемкой были получены в опытах с суспензией изолированных эпителиальных клеток слизистой оболочки тонкой кишки [12, 88, 89, 126, 136]. Так, при концентрации глюкозы в растворе, равной 0,8 мМ, ее концентрация в изолированных кишечных эпителиоцитах цыпленка была в 20 раз выше.

Известно, что в просвет тонкой кишки обращена только апикальная мембрана кишечного эпителиоцита с исчерченной каемкой. Существует топографическая и функциональная асимметрия различных участков мембраны этих клеток. Схематически организация кишечных эпителиоцитов представлена на рис. 6.2. Потоки вещества через базальную и латеральную мембраны в функциональном отношении однозначны и поэтому могут обозначаться как потоки вещества из кишечного эпителиоцита в сторону серозной оболочки (J_{cs}) и из серозного раствора в клетку (J_{ic}). В дальнейшем для краткости эти потоки будут именоваться по-

6-мг
сахара
Сахароза

токама через базальную мембрану. Для стационарного состояния, когда поддерживаются постоянные концентрации вещества в мукозном и серозном растворах, справедливы следующие соотношения потоков:

$$J_{mc} - J_{cm} = J_{cs} - J_{sc} = J_{ms} - J_{sm} = J_{net},$$

$$J_{ms} = \frac{J_{mc} \cdot J_{cs}}{J_{cm} + J_{cs}} \quad \text{и} \quad J_{sm} = \frac{J_{sc} \cdot J_{cm}}{J_{cm} + J_{cs}},$$

где J_{mc} — поток в клетку через апикальную мембрану, J_{cm} — поток из клетки через апикальную мембрану, J_{ms} — поток через клетку (ткань) из мукозного раствора (просвета кишки) в сторону серозы, J_{sm} — поток через ткань в обратном направлении, J_{net} — суммарный

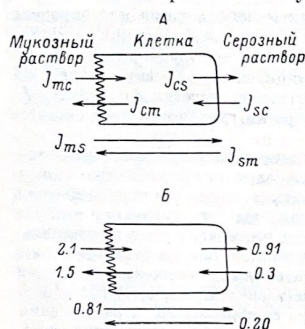


Рис. 6.2. Потоки сахара в кишечные эпителиоциты тонкой кишки. (По [80]).

А — схема потоков в клетку, из клетки и через клетку (объяснение в тексте). В — экспериментально найденные и рассчитанные значения потоков 3-О-метилглюкозы в кишечных эпителиоцитах тонкой кишки кролика (при концентрации сахара 20 мМ) с мукозной и серозной сторон клетки.

(разностный) поток из мукозного раствора в серозный. В эксперименте в условиях *in vitro* методически более легко определимы J_{mc} , J_{cm} и J_{mc} . Значения других потоков можно рассчитать по вышеприведенным формулам. На рис. 6.2 приведены значения потоков 3-О-метилглюкозы для эпителиальных клеток тонкой кишки кролика. Потоки через ткань были измерены с помощью 3-О-метилглюкозы- ^{14}C в условиях, когда изолированный участок стенки петли кишки использовался в виде мембраны, разделяющей два раствора с концентрацией 3-О-метилглюкозы 20 мМ. Величина потока через апикальную мембрану (J_{mc}) была определена в условиях кратковременной инкубации сегментов кишки, укрепленных на подложке и обращенных в раствор слизистой оболочки. Коррекция на внеклеточную фракцию 3-О-метилглюкозы определялась по распределению инулина.

В рассматриваемом опыте, несмотря на равенство концентраций 3-О-метилглюкозы с обеих сторон ткани, наблюдается перенос сахара через клетки ($J_{net} = 0.61$ мкмоль/см 2 /час). Этот поток обеспечивается за счет превышения J_{mc} над J_{cm} и J_{cs} над J_{sc} . Превышение J_{cs} над J_{sc} обусловлено более высокой концентрацией сахара в клетке по сравнению с концентрацией в серозном рас-

творе. В то же время более высокое значение J_{mc} по сравнению с J_{cm} наблюдается в условиях обратного отношения концентраций. Из анализа потоков следует вывод о локализации механизма активного транспорта в апикальной мембране кишечного эпителиоцита. Поэтому задача исследования механизма всасывания на клеточном уровне сводится в первую очередь к ответу на вопрос, чем обусловлено превышение J_{mc} над J_{cm} .

В опытах *in vitro*, например при работе с вывернутыми «мешочками», в замкнутом серозном объеме постепенно растет концентрация благодаря превышению J_{cs} над J_{sc} . По мере ее роста увеличивается J_{sc} , и этот процесс продолжается до тех пор, пока концентрация сахара в серозном объеме и клетке не выравнивается. В свою очередь увеличение J_{sc} ведет к повышению концентрации в клетке, в результате чего возрастает J_{cm} . В конце концов достигается состояние, когда $J_{mc} = J_{cm}$, $J_{cs} = J_{sc}$, $J_{ms} = J_{sm}$ и $J_{net} = 0$.

Поступление сахаров в клетки и перенос через ткань характеризуются специфическими чертами, присущими транспортной системе [4, 5]. К ним относятся стереоспецифичность транспорта, эффект насыщения потока (подчинение зависимости потока от концентрации уравнению Михаэлиса—Ментен), наличие конкуренции, наличие специфических ингибиторов транспорта, эффект противотока. Выше уже отмечалось, что не все сахара обладают способностью активно транспортироваться. Так, D-глюкоза абсорбируется во много раз интенсивнее, чем L-глюкоза. В отличие от D-галактозы не транспортируется активно L-галактоза. Практически не поступает в клетки L-манноза.

Исследование зависимости потока от концентрации позволяет определять константы транспорта: V_{max} — максимальную скорость транспорта и K_m — константу Михаэлиса, которая характеризует сродство транспортной системы к сахару (чем меньше значение, тем выше сродство). Значения K_m и V_{max} для глюкозы и ряда других сахаров приведены в табл. 6.1. Для одного и того же объекта величины K_m различных сахаров значительно отличаются, в то время как величины V_{max} практически одинаковы. Этот факт можно рассматривать как доказательство транспорта сахаров одной и той же системой. Различие величин K_m свидетельствует о различном сродстве исследованных сахаров к транспортной системе. Следует отметить, что в ранних работах [43] приводились более высокие значения K_m , что может объясняться методическими погрешностями. В частности, очень сильное влияние на измеряемые величины констант оказывает наличие перемешиваемого слоя у поверхности клеток, диффузия сахаров в котором становится лимитирующим звеном при низких концентрациях сахара и высокой скорости его транспорта через мембрану. В опытах на сегментах тощей кишки хомяка увеличение скорости перемешивания раствора приводило к снижению величин K_m глюкозы с 7.4 до 0.4 мМ [67]. В условиях *in vivo* практически невоз-

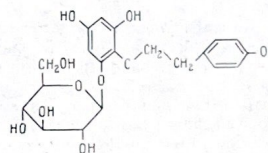
Таблица 6.1
Константы транспорта сахаров в кишечный эпителиоцит

Объект исследования	Сахар	K_m , мМ	V_{max}	Источ-ник
Сегменты тонкой кишки кролика	D-глюкоза	1.4	4.3 мкмоль/см ² /час	[82]
	D-галактоза	5.7	4.3	[82]
	3-О-метилглюкоза	18.5	4.3	[82]
То же хомяка	α -метилглюкозид	3.0	40 ммоль/л/10 мин.	[22]
	D-галактоза	9.0	44	[22]
	α -Метилгалактозид	9.0	44	[22]
	6-Дезоксигалактоза	7.0	6	[22]
	D-глюкоза	1.5	—	[44]
	D-галактоза	2.2	—	[44]
	1-Дезоксиглюкоза	7.4	—	[44]
	6-Дезоксиглюкоза	1.7	—	[20]
	Арбутин	3.6	—	[20]
	L-глюкоза	65.0	—	[35]
То же крысы	D-ксилоза	100.0	—	[16]
	D-глюкоза	0.4	9.3 мкмоль/см ² /час	[67]
	D-галактоза	10.0	—	[26]
	3-О-метилглюкоза	42.0	—	[26]
Сегменты и вывернутый «мешочек» тонкой кишки хомяка	D-глюкоза	1.5	0.2 моли/л/час	[26]
	6-Дезоксиглюкоза	2.0	0.2	[26]
	3-О-метилглюкоза	20.0	0.2	[26]
	D-ксилоза	70.0	0.2	[26]
	L-глюкоза	80.0	0.2	[26]
	L-фукоза	350.0	0.2	[26]

можно добиться высокой степени перемешивания пристепенного слоя.

При одновременном внесении в среду двух транспортируемых сахаров между ними наблюдается конкуренция за поступление в клетки. Степень торможения зависит от соотношения величин K_m для исследуемых сахаров и от соотношения их концентраций. Тормозящая способность данного сахара характеризуется константой торможения — K_i , которая численно равна концентрации, вызывающей 50%-е торможение поступления другого сахара. Наличие взаимной конкуренции может служить доказательством транспорта исследуемых сахаров одной системой. Действительно, глюкоза тормозит поступление в кишечные эпителиоциты таких сахаров, как 3-О-метилглюкоза, галактоза, и практически не влияет на абсорбцию фруктозы. В некоторых работах [20, 23, 26] было описано взаимовлияние аккумулярируемых и неаккумулярируемых сахаров. Предполагается [37], что неактивно транспортируемые сахара могут связываться на внешней поверхности мембраны на тех же местах, что и активно транспортируемые сахара. Однако образующийся комплекс не способен к движению через мембрану.

Эффектом конкуренции на уровне транспорта через апикальную мембрану объясняется специфическое тормозящее действие флоридина (флоридина), имеющего следующую формулу:



Флоридин конкурентно тормозит транспорт сахаров во всех тканях. В клетках эпителия тонкой кишки и почек тормозящее действие флоридина вызывается концентрациями, в 100—1000 раз более низкими. Для клеток эпителия тонкой кишки приводятся величины K_i флоридина от 2 до 0.2 мМ. Флоридин связывается мембранами кишечных эпителиоцитов, что показано в опытах с неповрежденными клетками и фракциями исчерпанной каемки кишечных эпителиоцитов и почек [31, 65, 79, 143]. При этом внутрь клеток флоридин практически не проникает, что доказывалось автордиографическими исследованиями распределения флоридина [137]. Следовательно, флоридин тормозит абсорбцию сахаров за счет его связывания на местах транспорта, хотя сами молекулы флоридина через мембрану транспортироваться не могут.

Для объяснения очень высокого сродства флоридина к транспортной системе привлекаются гипотезы о двухточечном взаимодействии флоридина с мембраной или специфическом гидролизе флоридина [5].

Наконец, характерной чертой транспортной системы, часто рассматриваемой в качестве одной из самых важных, является так называемый эффект противотока. Его сущность состоит в индуцировании потока одного вещества против градиента концентрации противоположно направленным потоком другого вещества, транспортируемого той же системой. Объясняется эффект противотока тем, что внесение второго транспортируемого вещества с одной стороны мембраны конкурентно снижает поток уже присутствовавшего вещества только в одном направлении, и таким образом создается асимметрия потоков при равенстве концентраций. В опытах на кишечных эпителиоцитах было показано, что после достижения стационарного распределения D-ксилозы или L-глюкозы внесение в мукозный раствор D-глюкозы вызывает выход этих сахаров из ткани в среду против их концентрационного градиента [16, 35, 124].

Все рассмотренные черты транспорта относились к апикальной мембране кишечного эпителиоцита. Характер транспорта сахаров через базальную и латеральные мембраны остается пока малоисследованным. В ряде работ, выполненных в условиях *in vitro*, был сделан вывод о наличии в латеральных и базальной мембранах системы пассивного транспорта сахаров, отличающейся по своим характеристикам от системы транспорта в апикальной мембране [28, 109, 110]. Эта система транспорта не зависит от Na^+ (соответственно не тормозится оубанином) и нечувствительна к флоризицину.

Иные результаты были получены в работах, выполненных в условиях *in vivo*. Сначала с помощью специальной гистохимической техники, а затем путем прямого анализа содержания глюкозы в полости кишки, в крови и тканях было установлено, что концентрация глюкозы в эпителии тонкой кишки намного ниже, чем в крови или полости кишки [8, 9]. Параллельные опыты в условиях *in vitro* подтвердили нормальную способность изолированных препаратов тонкой кишки от тех же животных накапливать глюкозу в концентрации более высокой, чем в среде. Поэтому авторами названных работ было высказано предположение о наличии в базальной и латеральных мембранах кишечных эпителиоцитов механизма активной откачки сахара. Авторы считают, что изоляция тканей приводит к нарушению нормальной работы откачивающего насоса, что при сохранении активного транспорта в апикальной мембране делает возможной аккумуляцию сахара в кишечных эпителиоцитах. Аналогичные данные были получены и при применении неметаболизируемой 3-О-метилглюкозы [69]. Авторы последней работы также говорят об активном транспорте сахара через базальную мембрану, полагая, что функция активного транспорта в апикальной мембране сводится к ускорению переноса глюкозы и других сахаров из полости кишки в эпителиальные клетки слизистой оболочки.

Безусловно, окончательное решение вопроса о характере транспорта сахаров через базальную и латеральные мембраны имеет принципиальное значение. Но интерпретация результатов опытов *in vivo* не является единственно возможной. В частности, допустимо предположение о практически одностороннем потоке жидкости через межклеточные щели в условиях интенсивного всасывания, что должно приводить к резкому снижению концентрации сахара в крови. Вместе с тем напрашивается аналогия между проблемой второго сахарного насоса и историей вопроса о характере транспорта ионов Cl^- через мембраны эпителиоцита. Первоначально на основании опытов, выполненных в условиях *in vitro*, в литературе господствовала точка зрения о пассивном характере переноса Cl^- . Но в дальнейшем оказалось, что результаты существенным образом зависят от времени, прошедшего после изоляции тканей из организма.

6.4. ЗАВИСИМОСТЬ АБСОРБЦИИ САХАРОВ ОТ ИОНОВ НАТРИЯ

Исследования, проведенные за последние 15 лет, с несомненностью доказали, что активный характер транспорта сахаров через апикальную мембрану кишечного эпителиоцита обеспечивается за счет сопряжения транспорта сахара и ионов натрия. Хотя по поводу непосредственного механизма сопряжения высказываются различные точки зрения, сам факт зависимости можно считать общепризнанным. Установлено, что для аккумуляции сахара в эпителиальных клетках и соответственно пере-

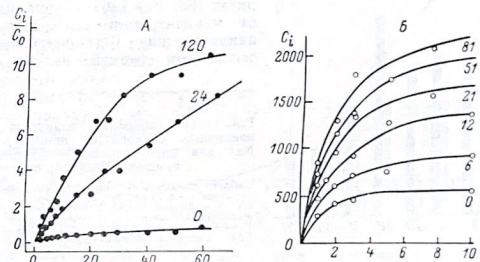


Рис. 6.3. Зависимость аккумуляции сахаров кишечными эпителиоцитами тонкой кишки от концентрации Na^+ .

А — аккумуляция 6-дезоксиглюкозы сегментами тонкой кишки хомини (по [49]), Б — аккумуляция галактозы изолированными кишечными эпителиоцитами тонкой кишки крысы (по [89]). По оси абсцисс — время инкубации, мин., по оси ординат: на А — отношение концентрации сахара в ткани к концентрации в среде, на Б — внутриклеточная концентрация галактозы, усл. ед. Цифры у кривых — концентрации Na^+ в среде, мМ.

носа сахара против градиента концентрации необходимо присутствие в просвете тонкой кишки ионов Na^+ в концентрации, превышающей внутриклеточную. При замене Na^+ на другие ионы или замене NaCl на другие вещества аккумуляция и транспорт против градиента подавляются. Этот факт показан в работах, выполненных в условиях *in vitro* [43, 45, 47, 48, 52, 127] и подтвержден в опытах *in vivo* [14, 84, 123]. Следует подчеркнуть, что зависимость абсорбции сахара от ионов Na^+ наблюдается не во всех отделах тонкой кишки, а только в тощей и подвздошной кишках, т. е. там, где происходит интенсивное всасывание сахара. Заметим также, что вопрос об истинной концентрации Na^+ в просвете тонкой кишки в условиях *in vivo* и механизмах ее регуляции остается пока недостаточно изученным. Поступление Na^+ с пищей не может обеспечить требуемой концентрации,

тем более что пища, богатая углеводами, как правило, бедна Na^+ . Поэтому основным источником, поддерживающим высокий уровень Na^+ в полости кишки, служит его секреция в ее проксимальных отделах. В процессе пищеварения происходит круговорот Na^+ , секреция в верхних отделах кишечника и абсорбция в последующих отделах (см. гл. 3 и 11).

Необходимость Na^+ для обеспечения всасывания против градиента концентрации была показана практически для всех активно транспортируемых сахаров на разных объектах [23, 26, 27, 29, 47, 48, 52, 59, 60, 82, 120, 127]. В последние годы эти данные были подтверждены в опытах на изолированных кишечных эпителиоцитах [88, 89, 126]. Зависимость от концентрации Na^+ в среде аккумуляции 6-дезоксиглюкозы сегментами тонкой кишки хо-

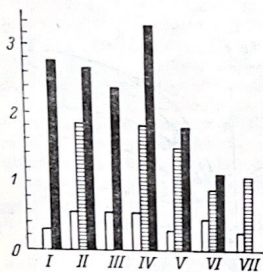


Рис. 6.4. Зависимость величины K_m различных сахаров от концентрации Na^+ для клеток кишечного эпителия хомяка. (По [26]).

Светлые столбики — среда без Na^+ , заштрихованные — с 72 мМ Na^+ , темные — с 145 мМ Na^+ . I — D-глюкоза, II — D-галактоза, III — 6-дезоксиглюкоза, IV — α-метилглюкоза, V — 3-O-метилглюкоза, VI — D-ксилоза, VII — L-глюкоза. Шкала выражена в $-\lg K_m$.

мяка и аккумуляции галактозы изолированными кишечными эпителиоцитами цыпленка иллюстрирует рис. 6.3.

При отсутствии Na^+ полностью подавлялся транспорт сахара против градиента концентрации. Если убрать Na^+ из среды в момент, когда аккумуляция сахара уже закончилась, то наблюдается выход сахара из клеток, причем коэффициент распределения может падать ниже 1 [15].

Анализ кинетики транспорта сахара при различных концентрациях Na^+ позволил определить характер влияния Na^+ на транспортные константы. По неясным пока причинам изменения констант оказались различными для разных объектов. В опытах на кишечных эпителиоцитах хомяка и крысы было найдено, что при снижении концентрации Na^+ происходит увеличение K_m без изменения V_{max} , т. е. уменьшение концентрации Na^+ действует как конкурентный ингибитор [26, 49, 101, 102]. При концентрациях Na^+ в среде, составляющих соответственно 145, 48, 24 и 0 мМ, значения K_m для 6-дезоксиглюкозы оказались равными 4, 15, 40 и 100 мМ, т. е. при отсутствии в среде Na^+ сродство сахара к транспортной системе снижалось в 25 раз. Зависимость K_m от Na^+ для 7 сахаров, полученная в опытах на сегментах кишечника хомяка, представлена на рис. 6.4.

Как у большинства клеток животных, внутриклеточная концентрация Na^+ в кишечных эпителиоцитах ниже, чем в плазме крови. В условиях *in vitro* она составляет около 50 мМ при концентрации Na^+ в среде 120–140 мМ [34, 94]. Следовательно, зависящее от ионов Na^+ сродство сахара к транспортной системе должно быть неодинаково для внутренней и внешней поверхностей мембраны. За счет существования градиента Na^+ создается асимметрия в свойствах транспортной системы сахара, которая и определяет возможность транспорта сахара против градиента концентрации. Влияние асимметрии в значениях K_m на создание градиента сахара видно на графике (рис. 6.5), где две прямые отражают зависимости потока от концентрации (в обратных величинах), характеризующиеся одинаковым значением V_{max} и различным значением K_m . Одна из прямых соответствует условиям зависимости потока от концентрации сахара для внешней стороны мембраны, другая — для внутренней. Стационарное состояние достигается лишь при разных концентрациях сахара в клетке и среде. Иными словами, для обеспечения из клетки в среду потока, равного потоку в клетку, необходима более высокая внутриклеточная концентрация, так как величина потока обратно пропорциональна K_m . Из графика также следует, что зависимость транспорта сахара от ионов Na^+ проявляется только при невысоких концентрациях сахара, потому что по мере приближения скорости транспорта к V_{max} различие потоков становится все меньше.

В отличие от опытов на сегментах тонкой кишки хомяка и крысы в аналогичных опытах на тонкой кишке кролика снижение концентрации Na^+ приводило к уменьшению V_{max} без изменения K_m [82]. Наличие градиента Na^+ и в этом случае приводит к асимметрии в свойствах транспортной системы, но по другому параметру. По данным авторов цитируемой работы, уменьшение концентрации Na^+ с 130 до 21 мМ сопровождалось снижением V_{max} для 3-O-метилглюкозы с 4.3 до 1.4 мкмоль/см²/час.

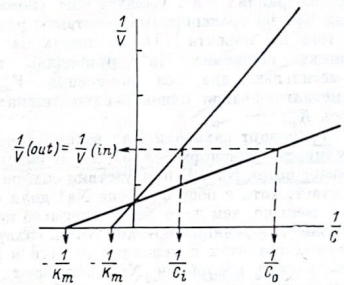


Рис. 6.5. График зависимости скорости транспорта (потока) от концентрации сахара (в обратных величинах), иллюстрирующий связь аккумуляции (различия C_1 и C_0) с различием значений K_m для внутренней и внешней стороны мембраны.

Объяснение в тексте.

Если считать, что оба типа влияния Na^+ на транспортные константы не обусловлены методическими различиями в постановке опытов, то наблюдаемое различие может отражать какие-то биологические особенности всасывания сахаров у различных животных. У той группы животных, где Na^+ влияет на K_m , уменьшение концентрации Na^+ может быть скомпенсировано увеличением концентрации сахара. При влиянии Na^+ на V_{\max} уменьшение содержания Na^+ в просвете кишечника будет вызывать одинаковое (в процентном отношении) снижение транспорта при любых концентрациях Na^+ . Следует еще упомянуть о различном влиянии Na^+ на транспортные константы разных субстратов у одного и того же объекта [19]. В опытах на тонкой кишке морской свинки снижение Na^+ приводило к увеличению K_m для α -метилглюкозида без изменения V_{\max} , в то время как для β -метилглюкозида одновременно снижалось V_{\max} и увеличивалась K_m .

Транспорт сахара и Na^+ взаимосвязан. Не только Na^+ стимулирует транспорт сахара, но и сахар в свою очередь увеличивает поток Na^+ . В присутствии сахара поток Na^+ в клетки возрастает, хотя в общем потоке Na^+ доля сахарозависимого потока Na^+ меньше, чем доля Na^+ -зависимого потока сахара в его общем потоке. Корреляция потоков Na^+ и сахара была показана на различных объектах в условиях *in vivo* и *in vitro* [33, 82, 84, 97]. Увеличение абсорбции Na^+ вызывают активно транспортируемые метаболизируемые и неметаболизируемые сахара. Следует отметить, что увеличение абсорбции Na^+ могут вызывать внесенные с серозной стороны быстро метаболизируемые глюкоза и манноза [25]. Механизм такого влияния в принципе отличен от механизма стимуляции потока Na^+ неутилизируемым сахаром, внесенным со стороны слизистой оболочки.

Для исследования взаимосвязи транспорта Na^+ и сахара часто применяется экспериментально удобный метод измерения трансмембранной разности потенциалов, или так называемого короткозамкнутого тока [24, 42, 101, 103, 131, 141]. Опыты с одновременным измерением короткозамкнутого тока и ионных потоков привели к выводу, что в большинстве случаев весь электрический ток через ткань создается активным потоком ионов Na^+ . Активный перенос ионов Na^+ , т. е. ток положительных зарядов, из мукозного раствора в серозный создает на стенке кишки падение потенциала со знаком плюс на стороне серозной оболочки. Эта разность потенциалов увеличивает пассивный поток Na^+ из серозного раствора в мукозный и поток Cl^- в обратном направлении. Образно говоря, активный поток Na^+ тянет за собой пассивный поток Cl^- , в результате чего через ткань переносится NaCl . Таким образом, короткозамкнутый ток и трансмембранная разность потенциалов могут служить показателями переноса через ткань ионов Na^+ . Следует, однако, отметить, что опыты с измерением только разности потенциалов могут приводить к ошибочным за-

ключениям, если не учитываются все методические факторы, влияющие на величину потенциала [128, 150].

Активно транспортируемые сахара вызывают увеличение трансмембранной разности потенциалов и короткозамкнутого тока [24, 101, 103, 122, 132, 150]. При внесении в мукозный раствор сахара новое значение потенциала устанавливается очень быстро, и величина потенциала зависит от концентрации сахара (рис. 6.6). Зависимость потенциала от потока сахара в клетку

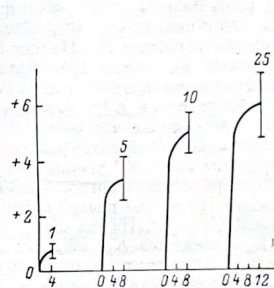


Рис. 6.6. Изменение во времени разности потенциалов между серозным и мукозным растворами после внесения глюкозы со стороны слизистой оболочки. (По [101]).
По оси абсцисс — время после внесения глюкозы, сек.; по оси ординат — разность потенциалов, мв. Цифры у кривых — концентрация глюкозы, мм.

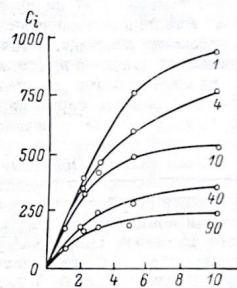


Рис. 6.7. Влияние ионов K^+ на аккумуляцию галактозы в изолированных кишечных эпителиоцитах тонкой кишки цыпленка. (По [89]).
По оси абсцисс — время инкубации, мин.; по оси ординат — внутриклеточная концентрация галактозы, усл. ед. Цифры у кривых — концентрация K^+ в среде, мм. Концентрация Na^+ в среде 20 мм.

доказывается подавлением сахарозависимого прироста потенциала флоридином. Сахарозависимые величины разности потенциалов и короткозамкнутого тока связаны с концентрацией сахара уравнением Михаэлиса—Ментен. Поэтому на основе электрических измерений можно определить константы Михаэлиса для активно транспортируемых сахаров. Если увеличение потенциала или тока обеспечивается благодаря потоку сахара по его транспортной системе, то величины K_m , определенные по потенциалу, должны совпадать с найденными по зависимости потока сахара от концентрации. Действительно, наблюдается довольно хорошее совпадение значений K_m , полученных в обеих постановках опыта [5, 61].

Во всех приведенных выше опытах по влиянию Na^+ уменьшение его концентрации достигалось за счет замены этого иона другими катионами. Оказалось, что ионы K^+ , Rb^+ , Cs^+ , Li^+ ,

холина, аммония, гуанидина, триса не могут обеспечить функционирования системы активного транспорта сахара [33, 82]. В этом отношении ионы Na^+ оказываются уникальными, так же как и в процессе активации $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ азы. Следует подчеркнуть, что для обеспечения активного транспорта сахара, согласно большинству данных, необходимо присутствие ионов Na^+ во внешнем растворе, в то время как в системе активного транспорта Na^+ решающая роль принадлежит внутриклеточным ионам. Опыты с заменой Na^+ на другие ионы показали, что некоторые из них не только не замещают Na^+ , но и оказывают дополнительное тормозящее действие. К таким ионам относится K^+ . На рис. 6.7 представлены данные о влиянии ионов K^+ на аккумуляцию галактозы изолированными кишечными эпителиоцитами цыпленка.

На этом объекте тормозящий эффект ионов K^+ проявляется очень сильно. Выше отмечалось, что наличие градиента Na^+ между клеткой и средой создает асимметрию в свойствах транспортной системы сахара. Обратный градиент ионов K^+ усиливает эту асимметрию, поскольку средство сахара к транспортной системе с внутренней стороны мембраны снижается за счет низкой внутриклеточной концентрации Na^+ и высокой $-\text{K}^+$. На тех объектах, где под влиянием ионов Na^+ и K^+ изменяется K_m , их действие проявляется только при сравнительно невысоких концентрациях сахара. Поскольку ионы K^+ ускоряют гликолиз и дыхание, то при высоких концентрациях глюкозы, когда транспорт ее одинаков в натриевых и калиевых растворах, в последних может наблюдаться более высокий уровень поглощения глюкозы [56, 57]. Если в аналогичных опытах вместо глюкозы использовать неметаболизируемую 3-О-метилглюкозу, то разница в ее абсорбции не обнаруживается.

6.5. ЗАВИСИМОСТЬ ВСАСЫВАНИЯ САХАРОВ ОТ УРОВНЯ ОБМЕНА

Подавление противогradientного транспорта сахара в условиях аноксии или при действии метаболитических ядов было показано во многих работах [13, 43, 48]. Этот факт служит доказательством активного механизма всасывания, а в более ранних работах его использовали для постулирования гипотезы об участии реакций фосфорилирования в процессе транспорта. Однако возможность аккумуляции нефосфорилируемых сахаров (3-О-метилглюкоза, 6-дезоксиглюкоза) и другие экспериментальные факты заставили отказаться от этой гипотезы. Рассматривая вопрос о фосфорилировании, следует отметить, что сахара могут фосфорилироваться не только за счет АТФ в гексокиназной реакции, но и при помощи специальной фосфотрансферазной реакции с использованием фосфонолпирувата. Эта система широко представлена у бактерий и обеспечивает аккумуляцию многих сахаров [1, 2, 5]. Аналогичная система была найдена

и в слизистой оболочке тонкой кишки морской свинки [146]. Она обеспечивала фосфорилирование глюкозамина, галактозамина, глюкозы и фруктозы, но 3-О-метилглюкоза не фосфорилировалась. Следовательно, и фосфонолпируватзависимое фосфорилирование не может быть ответственно за активный транспорт сахаров в эпителиальных клетках тонкой кишки.

Из метаболитических ядов наиболее часто применяется 2,4-динитрофенол, который вызывает практически полное подавление аккумуляции сахара. Влияние динитрофенола на поступление галактозы в изолированные кишечные эпителиоциты цыпленка иллюстрирует рис. 6.8. Внесение ингибитора после начала опыта, в момент, когда внутриклеточная концентрация галактозы превышала внешнюю, приводило к выходу галактозы из клеток. Уро-

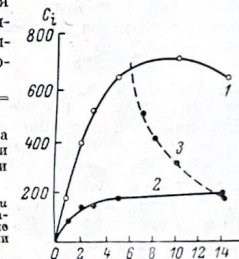


Рис. 6.8. Влияние 2,4-динитрофенола на аккумуляцию галактозы изолированными кишечными эпителиоцитами тонкой кишки цыплят. (По [89]).

По оси абсцисс — время инкубации, мин.; по оси ординат — внутриклеточная концентрация галактозы, усл. ед. 1 — контроль, 2 — действие 2,4-динитрофенола, 3 — изменение аккумуляции после введения 2,4-динитрофенола.

вень ее был таким же, как и при внесении динитрофенола в начале опыта. Необходимо отметить, что в опытах на целой ткани эффект ингибиторов развивался медленнее.

При подавлении аккумуляции ингибиторами или аноксией сохраняются все характерные черты транспортной системы, т. е. активный транспорт превращается в пассивный, хотя за счет неспецифического повреждения в этих условиях может возрасти и диффузионный поток. Сохранение свойств транспортной системы доказывается наличием конкуренции между активно транспортируемыми сахарами, уменьшением скорости транспорта при замене Na^+ на K^+ [29]. Было даже показано, что после достижения равновесного распределения сахара замена Na^+ на трис приводит к выходу сахара из клеток против градиента концентрации, т. е. сохраняется зависимость величины потока от градиента Na^+ [46]. Следовательно, энергия метаболизма необходима для обеспечения условий аккумуляции сахара, в то время как специфичная транспортная система сахара функционирует без затраты энергии. Возможные механизмы использования энергии для противогradientного транспорта сахара будут рассмотрены ниже.

6.6. МЕХАНИЗМ ВСАСЫВАНИЯ САХАРОВ

Как уже отмечалось, поступление сахара из просвета тонкой кишки в кровь может осуществляться различными путями, но при всасывании глюкозы основную роль играет активный транспорт. Поэтому рассмотрение механизма всасывания сводится в первую очередь к анализу возможных механизмов противогradientного транспорта глюкозы и ее аналогов.

Основной чертой специфичного пассивного или активного транспорта является способность «узнавать» субстрат, обусловленная наличием в мембране специальных мест связывания транспортируемого вещества. Систему транспорта можно уподобить ферментативной системе с той только разницей, что результатом ферментативной реакции является преобразование субстрата в новый продукт, а результат транспортной реакции состоит в транслокации вещества. Предполагается, что в мембране локализованы специфические комплексы-переносчики, функция которых заключается в обеспечении переноса через мембрану вещества определенной структуры. Непосредственный механизм переноса остается пока неизученным, но термин «переносчик» и анализ особенностей транспорта на базе переносчиковой модели используются очень широко. При этом под переносчиком в широком смысле подразумевается транспортный локус в мембране, обеспечивающий переход вещества из водной фазы в фазу мембраны и не обязательно обладающий способностью диффундировать в мембране.

Особенностью транспорта сахаров в клетках эпителия тонкой кишки является зависимость его от ионов Na^+ . Такая же зависимость аккумуляции от ионного состава среды наблюдается и в случае аминокислот, что показано практически для всех животных клеток, обладающих способностью транспортировать аминокислоты против градиента концентрации [39, 40, 127]. Поэтому выводы о возможных механизмах сопряжения транспорта сахара и ионов Na^+ в эпителии тонкой кишки базируются на анализе данных о Na^+ -зависимом транспорте в различных клетках.

Наиболее распространенная точка зрения состоит в предположении о сопряженном транспорте сахара (аминокислоты) и Na^+ одной системой. Безусловно, речь идет не о всем потоке Na^+ , а только о его сахарозависимой фракции. В сопряженной системе ионы Na^+ выступают в роли модификаторов переносчиков, и благодаря наличию градиента Na^+ между клеткой и средой количество модифицированных переносчиков с внешней и внутренней сторон мембраны оказывается неодинаковым. Таким образом создается асимметрия в свойствах мембраны, что и обеспечивает противогradientный транспорт. Влияние ионов K^+ , обратное по знаку влиянию ионов Na^+ , и наличие обратного по направле-

нию градиента K^+ увеличивают асимметрию системы. Необходимо подчеркнуть, что для функционирования противогradientного транспорта недостаточно только присутствие ионов Na^+ и K^+ в различных концентрациях: ионы, модифицирующие свойства переносчика, должны также транспортироваться. Как было изложено, в опыте действительно наблюдается корреляция потоков Na^+ и сахара.

В рассматриваемой схеме сопряженного транспорта аккумуляция сахара не сопровождается затратой энергии непосредственно в самом этом процессе. Движущей силой, обеспечивающей перенос молекул сахара против градиента концентрации, является градиент концентрации Na^+ . Следовательно, на транспорт сахара расходуется энергия, запасенная ранее в виде градиента концентрации Na^+ . Естественно, что за счет дополнительного поступления в клетку ионов Na^+ вместе с сахаром градиент концентрации Na^+ снижается. Для обеспечения бесперебойной работы системы сопряженного транспорта градиент должен поддерживаться постоянным и ионы Na^+ откачиваться из клетки. На этот процесс активного транспорта Na^+ из клетки затрачивается энергия АТФ. Таким образом, на аккумуляцию сахара постоянно расходуется энергия АТФ, но не в процессе транспорта сахара, а при последующем этапе откачки Na^+ . Поэтому любое воздействие на клетку, приводящее к торможению натриевого насоса либо за счет прямого влияния на активный транспорт Na^+ , либо за счет подавления энергетического обмена, должно приводить к снижению уровня аккумуляции сахара. С этой позиции подавление аккумуляции сахара в условиях аноксии или при действии метаболических ингибиторов является следствием повышения концентрации внутриклеточного Na^+ из-за прекращения работы натриевого насоса. Система сопряженного транспорта продолжает работать, но в силу одинакового влияния Na^+ с обеих сторон мембраны система становится симметричной и активный характер транспорта утрачивается.

Аналогичного подавления аккумуляции можно достичь путем торможения натриевого насоса специфическим ингибитором — строфантином (оубаином). В опытах на отрезке кишки строфантин вызывает эффект только при внесении его со стороны серозной оболочки [52—55, 113], что рассматривается как результат торможения насоса на базальной границе клетки. Действительно, экспериментальные данные о распределении Na^+ — K^+ -активируемой АТФазы в мембранных фракциях указывают на локализацию насоса преимущественно в базальной и латеральных мембранах [66, 117, 138]. Поэтому предполагается, что ионы Na^+ , поступающие в клетки через апикальную мембрану вместе с сахаром или аминокислотой, откачиваются из клетки через латеральные и базальную мембраны. В результате, несмотря на поступление в клетки Na^+ , его концентрация поддерживается постоянной и через клетки переносятся одновременно сахар и Na^+ .

Изложенную выше точку зрения называют гипотезой сопряженного транспорта натрия и сахара или гипотезой натриевого градиента. Другой подход к объяснению зависимости транспорта сахара от Na^+ заключается в постулировании прямой связи между натриевым насосом и активным транспортом сахара. Предполагается, что аккумуляция сахара обеспечивается за счет непосредственного использования энергии промежуточного макроэргического соединения, образующегося при функционировании натриевого насоса [52, 63, 64, 89, 90]. Согласно этой точке зрения, транспорт сахара против градиента концентрации фактически зависит не от внешней, а от внутриклеточной концентрации Na^+ и определяется не градиентом Na^+ , а функционированием насоса. Отсутствие Na^+ в среде приводит к снижению аккумуляции сахара из-за уменьшения внутриклеточной концентрации Na^+ . Ингибиторы активного транспорта Na^+ и ингибиторы обмена подавляют функционирование натриевого насоса и лишают таким путем транспорт сахара источника энергии. Следует подчеркнуть, что для снабжения энергией транспорта сахара необходимо функционирование только начального этапа насоса — образования промежуточного фосфорилированного комплекса, которое катализируется ионами Na^+ . При нормальной работе насоса в присутствии ионов K^+ происходит дефосфорилирование и энергия расходуется на перенос ионов Na^+ и K^+ . При полном использовании энергии для нужд транспорта сахара противградиентного переноса ионов не происходит. Сахар должен выступать в роли ингибитора активного транспорта Na^+ и K^+ . Действительно, сахара и флоридин тормозят Na^+ - K^+ -АТФазу [7, 63, 64]. Однако прямые эксперименты показывают стимуляцию, а не торможение активного транспорта Na^+ в присутствии транспортируемых сахаров [77].

Другая группа фактов в пользу развиваемой гипотезы была получена в опытах на изолированных кишечных эпителиоцитах цыплят [88—90]. Была доказана возможность аккумуляция галактозы при обратном градиенте Na^+ , когда его концентрация в клетке была выше, чем в среде. Но можно отметить, что аналогичный факт аккумуляции аминокислот при обратном градиенте Na^+ , описанный в работах на опухолевых клетках, получил объяснение в рамках «градиентной» гипотезы, учитывающей влияние ионов K^+ [87, 127]. Не вызывает сомнения возможность аккумуляции аминокислот в клетках, лишенных АТФ [145]. И в опытах на слизистой оболочке тощей кишки крысы не наблюдалось прямой корреляции между уровнем АТФ и степенью аккумуляции сахара [98].

Заключив рассмотрение «натриевых» гипотез, следует подчеркнуть, что сторонники и той и другой точек зрения имеют в своем активе факты, выходящие за рамки простых схем и требующие дополнительных предположений [81, 90, 91, 111]. Существенным новым моментом являются полученные недавно до-

казательства электрогенной природы сопряженного Na^+ -сахарного транспорта. В опытах с изолированной фракцией исчерченной каемки эпителиоцитов тонкой кишки крысы была убедительно показана зависимость сопряженного с Na^+ поглощения глюкозы от величины мембранного потенциала независимо от природы создающего его ионного градиента [108].

Молекулярные основы транспорта сахара пока остаются неизвестными. Для решения проблемы необходимо научиться выделять компоненты транспортной системы и определять характер связи молекул сахара с местами транспорта (переносчиками). В настоящее время наибольшие успехи в деле идентификации компонентов транспортных систем достигнуты в опытах на микроорганизмах. Из мембран бактерий и дрожжей выделены и очищены белки, специфически связывающие сахара и несомненно входящие в транспортную систему [1, 2, 5]. Эти белки могут рассматриваться как первое звено системы, обеспечивающее специфическую рецепцию сахара на поверхности мембраны. Вопрос о возможности их транслокации в мембране и изменении свойств, необходимых для обеспечения активного транспорта, остается открытым. У бактерий была также обнаружена многокомпонентная система одновременного транспорта и фосфорилирования сахара, обеспечивающая аккумуляцию сахара. Идентифицированы ее компоненты, ответственные за специфичность связывания сахара.

В отличие от бактерий животные клетки, вероятно, содержат транспортные белки в значительно меньших количествах, и их обнаружение и выделение представляет большие трудности. В настоящее время экспериментальная работа направлена на уточнение локализации мест транспорта. Основной методический подход заключается в выявлении различия между связыванием клеточными компонентами транспортируемого и нетранспортируемого сахара. В опытах с фракцией исчерченной каемки эпителиоцитов тонкой кишки было обнаружено преимущественное связывание D-глюкозы по сравнению с L-глюкозой или D-маннозой [68, 70, 73, 86, 115]. Связывание тормозилось флоридином и некоторыми активно транспортируемыми сахарами, но не зависело от Na^+ . Было определено K_D связывания, оказавшееся равным 2 мкМ, т. е. значительно более низким, чем K_m транспорта. Большая часть связанной D-глюкозы обнаруживалась во внутреннем содержимом микроворсинок, хотя наблюдалось связывание и мембранным материалом [86]. Поскольку характеристика связывания существенно отличалась от характеристик транспорта, было высказано предположение, что связывание в основном определяется гексокиназой. Позднее появились сообщения и о Na^+ -зависимом связывании глюкозы [71, 72], но низкая величина K_D заставляет думать о возможности бактериального источника, ответственного за связывание [144], что и было доказано в аналогичных опытах на мембранной фракции из эпителия

почек [105]. Зависимое от Na^+ связывание глюкозы наблюдалось на выделенных из исчерпанной каемки кишечных эпителиоцитов инвертазно-изомальтазных комплексах [134]. Однако в этом случае связывание не тормозилось флоридином.

Рассматривая вопрос об идентификации мест транспорта в эпителиоцитах тонкой кишки, стоит остановиться на аналогичных работах, выполненных на фракции щеточной каемки нефроцита [31, 74, 142, 143]. Для выявления мест транспорта использовался меченый флоридин. Было обнаружено два места связи флоридина, различающиеся по значениям константы диссоциации и чувствительности к N-этилмалеимиду. Для одного из мест связи величина K_D совпала с K_i флоридина, определенной по торможению транспорта сахаров. Связывание флоридина на этом месте тормозилось глюкозой и зависело от Na^+ , что делает весьма вероятным предположение об идентичности места связывания флоридина и места транспорта сахара.

Для выяснения химической природы взаимодействия молекулы сахара с местом транспорта (переносчиком) исследовалась корреляция между структурой молекулы сахара и его транспортными характеристиками. В опытах на клетках эпителия тонкой кишки применялся большой набор сахаров и их производных [22, 23, 43, 95, 148]. Оказалось, что для активного транспорта сахара по Na^+ -зависимой системе абсолютно необходимо наличие гидроксильной группы у C_2 сахара в том же положении, как у D-глюкозы. Наиболее вероятно образование между молекулой сахара и местом транспорта водородной связи с участием этого гидроксильного атома. Добавочные водородные связи между кислородными атомами других гидроксильных групп и транспортным локусом усиливают взаимодействие сахара с мембраной. Следует отметить, что в литературе встречаются предположения и об образовании в процессе транспорта ковалентной связи между кислородным атомом у C_2 сахара и углеродным атомом химической группировки мембраны [23], но экспериментального подтверждения они не получили [140]. Относительно механизма влияния ионов Na^+ на характер связи молекулы сахара с переносчиком экспериментальные данные пока отсутствуют. Логично предположить, что ионы Na^+ должны влиять на возможность замыкания связи по C_2 сахара, вероятнее всего за счет аллостерического влияния на конформацию «активного центра» переносчика.

6.7. ВЗАИМОЗАВИСИМОСТЬ ТРАНСПОРТА САХАРОВ И АМИНОКИСЛОТ

Транспорт аминокислот в кишечных эпителиоцитах по своим характеристикам однотипен транспорту сахаров и также зависит от ионов Na^+ . Естественно, возникает вопрос, работают ли обе транспортные системы независимо, или существуют полифункциональные транспортные места.

Не вызывает сомнения относительная автономность обеих систем. Например, ингибитор транспорта сахаров флоридин не влияет на аккумуляцию аминокислот. Сахара и аминокислоты независимо увеличивают перенос Na^+ через эпителиальные клетки [116, 133], что свидетельствует в пользу автономной локализации мест связывания Na^+ в процессе транспорта сахара и аминокислоты.

В то же время имеются многочисленные данные о взаимном тормозящем влиянии сахаров и аминокислот при их одновременном транспорте [17, 18, 30, 38, 106, 107, 114, 116, 118, 119, 125]. Существенно отметить, что торможение это неполное и неконкурентное, т. е. изменяется V_{\max} транспорта, а не K_m , и нельзя получить полного подавления транспорта за счет увеличения концентрации вещества, выступающего в роли ингибитора. По данным большинства авторов, из сахаров наибольшее влияние на транспорт оказывает галактоза. На этом основании даже высказывалось предположение о механизме торможения за счет токсического действия галактозо-1-фосфата [125]. Однако в зависимости от условий эксперимента одинаковое с галактозой или более сильное торможение может оказывать глюкоза [38, 121], которая в свою очередь в иной постановке опыта вызывает не торможение, а стимуляцию транспорта аминокислот [62, 106, 114]. Активно не транспортируемая, но метаболизируемая фруктоза или не оказывает эффекта, или увеличивает аккумуляцию аминокислот [18, 119, 121].

Для понимания механизма торможения существенное значение имеет дифференцированный анализ влияния сахаров на поток аминокислот. В наиболее точной методике измерения однонаправленного потока внутрь клетки через апикальную мембрану в опытах на кишечных эпителиоцитах кролика не было обнаружено какого-либо влияния сахара на поток аланина [38, 76], хотя при менее точном методе и другом отношении концентраций сахара и аминокислоты на этом же объекте было получено торможение потока фенилаланина глюкозой [121]. Аналогичные данные приводятся в работах, выполненных на тонкой кишке хомяка и крысы [18, 119]. Естественно, что в зависимости от результатов опыта и объяснение механизма торможения оказывается различным. Если сахар тормозит поток аминокислоты в клетку, местом взаимодействия должна быть внешняя поверхность апикальной мембраны. Поэтому делается предположение об аллостерическом влиянии сахаров и аминокислот при связывании на местах транспорта, расположенных в непосредственной близости и образующих полифункциональный транспортный локус [17, 121]. Если сахар не тормозит поток аминокислоты в клетку, но снижает уровень аккумуляции, то делается вывод о стимуляции в присутствии сахара потока аминокислоты из клетки в мускульный раствор. Следовательно, местом взаимодействия сахара и аминокислоты должна быть внутренняя поверхность апикальной мембраны.

почек [105]. Зависимое от Na^+ связывание глюкозы наблюдалось на выделенных из исчерпанной каемки кишечных эпителиоцитов инвертано-изомальтазных комплексах [134]. Однако в этом случае связывание не тормозилось флоридином.

Рассматривая вопрос об идентификации мест транспорта в эпителиоцитах тонкой кишки, стоит остановиться на аналогичных работах, выполненных на фракции щеточной каемки нефрота [31, 74, 142, 143]. Для выявления мест транспорта использовался меченый флоридин. Было обнаружено два места связи флоридина, различающиеся по значениям константы диссоциации и чувствительности к N-этилмалеимиду. Для одного из мест связи величина K_D совпала с K_i флоридина, определенной по торможению транспорта сахаров. Связывание флоридина на этом месте тормозилось глюкозой и зависело от Na^+ , что делает весьма вероятным предположение об идентичности места связывания флоридина и места транспорта сахара.

Для выяснения химической природы взаимодействия молекулы сахара с местом транспорта (переносчиком) исследовалась корреляция между структурой молекулы сахара и его транспортными характеристиками. В опытах на клетках эпителия тонкой кишки применялся большой набор сахаров и их производных [22, 23, 43, 95, 148]. Оказалось, что для активного транспорта сахара по Na^+ -зависимой системе абсолютно необходимо наличие гидроксильной группы у C_2 сахара в том же положении, как у D-глюкозы. Наиболее вероятно образование между молекулой сахара и местом транспорта водородной связи с участием этого гидроксильного атома. Добавочные водородные связи между кислородными атомами других гидроксильных групп и транспортным локусом усиливают взаимодействие сахара с мембраной. Следует отметить, что в литературе встречаются предположения и об образовании в процессе транспорта ковалентной связи между кислородным атомом у C_2 сахара и углеродным атомом химической группы широчини мембраны [23], но экспериментального подтверждения они не получили [140]. Относительно механизма влияния ионов Na^+ на характер связи молекулы сахара с переносчиком экспериментальные данные пока отсутствуют. Логично предположить, что ионы Na^+ должны влиять на возможность замыкания связи по C_2 сахара, вероятнее всего за счет аллостерического влияния на конформацию «активного центра» переносчика.

6.7. ВЗАИМОЗАВИСИМОСТЬ ТРАНСПОРТА САХАРОВ И АМИНОКИСЛОТ

Транспорт аминокислот в кишечных эпителиоцитах по своим характеристикам неотличим от транспорта сахаров и также зависит от ионов Na^+ . Естественно, возникает вопрос, работают ли обе транспортные системы независимо, или существуют полифункциональные транспортные места.

Не вызывает сомнения относительная автономность обеих систем. Например, ингибитор транспорта сахаров флоридин не влияет на аккумуляцию аминокислот. Сахара и аминокислоты независимо увеличивают перенос Na^+ через эпителиальные клетки [116, 133], что свидетельствует в пользу автономной локализации мест связывания Na^+ в процессе транспорта сахара и аминокислоты.

В то же время имеются многочисленные данные о взаимном тормозящем влиянии сахаров и аминокислот при их одновременном транспорте [17, 18, 30, 38, 106, 107, 114, 116, 118, 119, 125]. Существенно отметить, что торможение это неполное и неконкурентное, т. е. изменяется V_{\max} транспорта, а не K_m , и нельзя получить полного подавления транспорта за счет увеличения концентрации вещества, выступающего в роли ингибитора. По данным большинства авторов, из сахаров наибольшее влияние на транспорт оказывает галактоза. На этом основании даже высказывалось предположение о механизме торможения за счет токсического действия галактозо-1-фосфата [125]. Однако в зависимости от условий эксперимента одинаковое с галактозой или более сильное торможение может оказывать глюкоза [38, 121], которая в свою очередь в иной постановке опыта вызывает не торможение, а стимуляцию транспорта аминокислот [62, 106, 114]. Активно не транспортируемая, но метаболизируемая фруктоза или не оказывает эффекта, или увеличивает аккумуляцию аминокислот [18, 119, 121].

Для понимания механизма торможения существенное значение имеет дифференцированный анализ влияния сахаров на поток аминокислот. В наиболее точной методике измерения однонаправленного потока внутрь клетки через апикальную мембрану в опытах на кишечных эпителиоцитах кролика не было обнаружено какого-либо влияния сахара на поток аланина [38, 76], хотя при менее точном методе и другом отношении концентраций сахара и аминокислоты на этом же объекте было получено торможение потока фенилаланина глюкозой [121]. Аналогичные данные приводятся в работах, выполненных на тонкой кишке хомяка и крысы [18, 119]. Естественно, что в зависимости от результатов опыта и объяснение механизма торможения оказывается различным. Если сахар тормозит поток аминокислоты в клетку, местом взаимодействия должна быть внешняя поверхность апикальной мембраны. Поэтому делается предположение об аллостерическом влиянии сахаров и аминокислот при связывании на местах транспорта, расположенных в непосредственной близости и образующих полифункциональный транспортный локус [17, 121]. Если сахар не тормозит поток аминокислоты в клетку, но снижает уровень аккумуляции, то делается вывод о стимуляции в присутствии сахара потока аминокислоты из клетки в мукозный раствор. Следовательно, местом взаимодействия сахара и аминокислоты должна быть внутренняя поверхность апикальной мембраны.

В этом случае наиболее вероятной причиной увеличения обратного потока аминокислоты и торможения аккумуляции представляется локальное возрастание внутриклеточной концентрации Na^+ , обусловленное дополнительным входом Na^+ вместе с сахаром [38, 76, 118, 135].

В опытах на изолированной мембранной фракции кишечных эпителиоцитов получены убедительные данные, свидетельствующие о том, что взаимовлияние потоков сахаров и аминокислот опосредуется через изменение мембранного потенциала [85]. Если Na^+ -зависимый поток вещества является электрогенным, то его наличие вызывает деполяризацию мембраны, а снижение мембранного потенциала приводит к уменьшению движущей силы для другого, аналогичного по знаку, электрогенного потока.

В литературе неоднократно высказывалось предположение о конкуренции сахаров и аминокислот на уровне снабжения энергией их транспортных систем [30, 106, 114, 119]. В пользу такой точки зрения говорят, например, опыты по частичному снятию эффекта торможения фруктозой и возможность при определенных условиях получать в присутствии глюкозы не торможение, а стимуляцию транспорта аминокислот. Значение глюкозы и фруктозы как энергетических источников не вызывает сомнения. Однако объяснение непосредственного механизма стимулирующего влияния глюкозы и фруктозы зависит от принятия той или иной точки зрения на природу сопряжения транспорта сахаров и аминокислот с источниками энергии. Если исходить из гипотезы натриевого градиента, дополнительное снабжение энергией в конечном счете приводит к более интенсивной откатке Na^+ , в то время как при дефиците энергетического снабжения клетка не справляется с компенсацией усиленного потока Na^+ внутрь клетки при одновременном транспорте сахара и аминокислоты. Если опираться на гипотезу прямого использования энергии в процессе транспорта сахаров и аминокислот, конкурентные отношения между ними могут проявляться только при дефиците АТФ и, следовательно, наличие эффекта торможения должно коррелировать со снижением уровня АТФ. Безусловно, как и в случае с Na^+ , это снижение может быть локальным.

Следовательно, непосредственная причина взаимного тормозящего влияния сахаров и аминокислот при их одновременном транспорте остается пока предметом дискуссии. Но сам факт не вызывает сомнения, хотя возможность его проявления в условиях *in vivo* требует экспериментального подтверждения, так как имеющиеся в литературе данные противоречивы [30, 41]. Поскольку конкурентные отношения наблюдаются только между Na^+ -зависимыми транспортными системами, можно полагать, что решающим условием проявления эффекта торможения является уровень натриевого градиента и способность клетки его поддерживать.

6.8. ТРАНСПОРТ САХАРОВ, НЕ ЗАВИСЯЩИЙ ОТ ИОНОВ НАТРИЯ

Из сахаров, абсорбция которых, по большинству данных, не зависит от Na^+ , наибольший интерес представляет фруктоза. Хорошо известно, что фруктоза абсорбируется и быстро метаболизируется как в условиях *in vivo*, так и *in vitro* [43, 147, 149]. Сопоставление скорости абсорбции глюкозы и фруктозы как из смеси мономеров, так и при гидролизе сахарозы показывает, что фруктоза поступает в кровь (или в серозную жидкость в условиях *in vitro*) медленнее глюкозы [10], но быстрее других нетранспортируемых активно сахаров, например L- и D-арабинозы.

Исследования транспорта фруктозы осложнены ее быстрым метаболизмом и конверсией в глюкозу. Скорость метаболизма фруктозы варьирует у различных видов животных. Так, при введении ^{14}C -фруктозы в петлю тонкой кишки крысы в плазме крови обнаруживалось от 25 до 75% неметаболизированной фруктозы и до 20% ^{14}C приходилось на долю глюкозы, а в аналогичных опытах на морской свинке 55–88% фруктозы превращалось в глюкозу и только 8–32% фруктозы поступало в кровь в неизменной форме [93]. Точная локализация ферментативных процессов, обеспечивающих конверсию фруктозы в глюкозу, требует дальнейших исследований, но более вероятным представляется вывод о внутриклеточном механизме. В литературе, однако, встречались предположения о превращении фруктозы в глюкозу как необходимом условии ее транспорта в клетку [43].

По своим характеристикам абсорбция фруктозы значительно отличается от таковой глюкозы. Транспорт фруктозы либо вообще не зависит от присутствия ионов Na^+ [83, 129], либо эта зависимость проявляется намного слабее [26]. Отсутствует торможение абсорбции флоридином, показанное в условиях *in vivo* и *in vitro* [43, 75, 83, 129], и только в одной работе описано снижение транспорта фруктозы в присутствии 0,5 мМ флоридина [26]. И наконец, абсорбция фруктозы практически не тормозится глюкозой и другими активно транспортируемыми сахарами [21, 83, 129]. Только в работе Билера [26] приводились данные о конкурентных отношениях между этими сахарами. В отличие от глюкозы абсорбция фруктозы не подавлялась аноксией и 2,4-динитрофенолом, хотя ее превращение в глюкозу в этих условиях тормозилось [75]. Все изложенные факты позволяют прийти к выводу, что поступление фруктозы в эпителиальные клетки тонкой кишки осуществляется иным путем, чем поступление глюкозы.

Исследование механизма абсорбции фруктозы показывает, что в ее основе лежит транспортный процесс, но, вероятно, в отличие от глюкозы не носящий активного характера. Доказательством наличия транспорта являются значительная скорость про-

цесса и эффект насыщения потока. При измерении начальной скорости транспорта внутриклеточный метаболизм не осложняет анализа кинетики, так как метаболизм в этом случае лимитирован транспортом. В этой методике в опытах на кишечных эпителиоцитах кролика было получено K_m , равное 18 мМ, и V_{max} — 6.3 мкмоль/см²/час [129]. Максимальная скорость транспорта фруктозы практически не отличается от V_{max} глюкозы, измеренной в аналогичных условиях на том же объекте, а K_m приблизительно в 10 раз выше, т. е. для достижения максимальных величин абсорбции концентрация фруктозы должна быть в 10 раз выше, чем глюкозы. Аналогичное различие K_m при близких V_{max} , хотя их абсолютные значения отличались от приведенных выше величин, было получено в опытах на собаках в условиях *in vivo* [21]. Из величин транспортных констант следует также, что при невысоких концентрациях (ниже K_m) скорость абсорбции глюкозы должна быть приблизительно в 10 раз выше, чем фруктозы, что соответствует экспериментальным данным [10]. Сравнивая характер абсорбции фруктозы и глюкозы, необходимо подчеркнуть, что при невысоких концентрациях сахаров в условиях дефицита Na⁺ поглощение фруктозы должно превалировать над глюкозой.

Система транспорта фруктозы обладает высокой специфичностью, так как наиболее близкая к фруктозе по структуре L-сорбоза тормозящего действия на абсорбцию фруктозы не оказывает [21, 83, 129]. Абсорбция сорбозы подчиняется диффузионной кинетике.

Метаболизируется клетками эпителия тонкой кишки, но считается активно не транспортируемой D-манноза. Только в опытах Билера [26] наблюдалась зависимость абсорбции маннозы от Na⁺, флоридина и глюкозы (или ее аналогов), что позволило автору прийти к заключению о частичном переносе маннозы транспортной системой глюкозы. Как упоминалось выше, метаболизируемые сахара — глюкоза и фруктоза — могут стимулировать транспорт аминокислот. Таким же действием обладает манноза [114], причем, как отмечают авторы цитируемой работы, стимулирующее действие проявляется сильнее при внесении маннозы со стороны серозной оболочки, что указывает на возможность поступления маннозы в клетки через базальную мембрану. Вероятно, в отличие от активно транспортируемых сахаров характер переноса маннозы через базальную и апикальную мембраны односторонний. При одинаковой концентрации маннозы и глюкозы со стороны серозной оболочки метаболизируется приблизительно равное количество каждого сахара, что может указывать на одинаковое их поступление через базальную мембрану. Когда глюкоза вносится в мукозный раствор, эквивалентное ее количество метаболизируется при концентрации, в 10 раз меньшей.

Для других активно не транспортируемых сахаров характер абсорбции сходен с абсорбцией активно транспортируемых сахаров в среде без Na⁺ или в присутствии флоридина. Их потоки

из мукозного раствора в серозный и в обратном направлении при одинаковом составе растворов практически равны. Например, в среде без Na⁺ поток 3-О-метилглюкозы снижался почти в 10 раз и становился равным потоку 2-дезоксиглюкозы или D-арабинозы, которые в свою очередь и в натриевой и безнатриевой среде лишь незначительно отличались от потока маннита [80, 82, 130]. Потоки 2-дезоксиглюкозы и D-арабинозы линейно зависели от концентрации, не тормозились глюкозой и флоридином. Аналогичные данные были получены в опытах с 3-О-метилглюкозой в среде без Na⁺. Поэтому был сделан вывод о диффузионной природе абсорбции активно не транспортируемых сахаров. К иному заключению о пассивно транспортной природе абсорбции пришел Билер [26], который в опытах на сегментах тонкой кишки хомяка получил для всех сахаров в отсутствие Na⁺ значения K_m порядка 300—600 мМ. Для активно транспортируемых сахаров в присутствии Na⁺ наблюдалось резкое снижение K_m , а для неаккумулируемых сахаров K_m не менялось. По мнению Билера [26], ионы Na⁺, соединяясь с переносчиком, увеличивают его сродство только для сахаров определенной структуры. Одновременно резко увеличивается сродство к флоридину.

Если опыты Билера будут подтверждены, то естественно локализовать транспортную систему для неаккумулируемых сахаров, как и Na⁺-зависимую систему, в апикальной мембране. Но в случае справедливости вывода о диффузионной природе абсорбции возникает вопрос о роли межклеточных каналов в этом процессе. Расчет коэффициента проницаемости для Na⁺-независимой абсорбции дает величины порядка 1—10·10⁻⁶ см/сек. [100, 130]. Если учесть общую всасывающую поверхность ворсинок и микроворсинок, то истинное значение коэффициента проницаемости может быть порядка 10⁻⁸ см/сек. У других клеток (эритроциты, мышечные волокна) диффузия сахаров через поверхностную мембрану характеризуется коэффициентом проницаемости порядка 10⁻³ см/сек, т. е. более низкими величинами. Поэтому можно думать, что диффузионный путь через эпителий тонкой кишки осуществляется не только через клетки, но и через межклеточные каналы. Зона, занимаемая последними, довольно велика, и для обеспечения диффузионного потока преимущественно через клетки диффузионная проницаемость межклеточных каналов (на единицу их поверхности) должна быть ниже, чем апикальной мембраны, что маловероятно.

При наличии осмотического градиента между серозным и мукозным растворами возникает конвекционный поток, который идет по тем же каналам, что и диффузионный. Как отмечалось, конвекционный поток может давать больший вклад в абсорбцию, чем чисто диффузионный, и его доля возрастает при увеличении концентрации сахара. Поэтому решение вопроса о локализации диффузионного и (соответственно конвекционного) пути весьма существенно для понимания природы абсорбции.

6.9. ПРОКСИМО-ДИСТАЛЬНЫЙ ГРАДИЕНТ ВСАСЫВАНИЯ САХАРОВ

Всасывание сахаров происходит во всех отделах тонкой кишки, но интенсивность абсорбции и ее характеристики несколько различны для тощей и подвздошной кишок. Поскольку существующие различия не носят принципиального характера, в изложенном материале не проводилось разграничения между опытами, выполненными на разных отделах тонкой кишки.

В проксимальной части тонкой кишки абсорбция сахаров осуществляется более интенсивно. Например, у человека скорость всасывания глюкозы в тощей кишке приблизительно в 3 раза выше, чем в подвздошной [32]. Наблюдаемая разница объясняется как большей всасывающей поверхностью, так и большей скоростью транспорта. Абсорбция сахаров в тощей кишке характеризуется более высокими значениями транспортных констант [21, 40], т. е. максимальная скорость абсорбции выше и достигается при больших концентрациях сахара. Биологическая значимость этого факта очевидна.

Во всех отделах тонкой кишки наблюдается сопряжение транспорта сахара и ионов Na^+ , но степень сопряжения может варьировать, что, вероятно, объясняется различиями в транспорте Na^+ . Более сильное влияние сахаров на перенос Na^+ в подвздошной кишке по сравнению с тощей наблюдалось в опытах *in vivo* на собаках [84] и в опытах *in vitro* на кролике и хомяке [103, 141]. Однако в аналогичных условиях в опытах на крысе поток Na^+ сильнее возрастал в присутствии глюкозы в тощей кишке [141]. Следует подчеркнуть, что влияние глюкозы на другие транспортные процессы в большей степени проявляется в проксимальных отделах кишечника, что связано со значительной интенсивностью аэробного гликолиза в тощей кишке [78]. Вероятно, различие обменных процессов может быть объяснено и снижением в дистальном направлении тормозящего эффекта аминокислот на транспорт сахаров [119]. Преобладание в тощей кишке гликолиза как основного энергетического процесса делает опыты на этом участке кишки более зависимыми от наличия глюкозы (или магнозы) в среде инкубации. В условиях *in vitro* стационарное состояние, в частности поддержание нормального ионного градиента, дольше сохраняется в кишечных эпителиоцитах подвздошной кишки [94]. В кишечных эпителиоцитах тощей кишки концентрация АТФ падает практически до нуля в течение первых минут инкубации в отсутствие субстрата [98].

Рассматривая вопрос о проксимо-дистальном градиенте необходимо иметь в виду неодинаковость его для различных веществ, видовые различия и возможность его изменения при сдвигах функционального состояния. Даже для таких близких по своим транспортным характеристикам сахаров, как D-глюкоза, 1-дезоксиглюкоза, D-галактоза, наблюдается несколько отличный гра-

диент [50]. Смещение зоны максимального всасывания в дистальном направлении обнаруживается при голодании и прекращении поступления α -амилазы в полость кишки [6, 10]. Значительное повышение всасывающей активности в подвздошной кишке наблюдается при резекции верхних отделов тонкой кишки [32].

ЛИТЕРАТУРА

1. Гершанович В. И. Биокатализаторы, осуществляющие транспорт углеводов у бактерий. — Успехи совр. биол., 1971, т. 72, № 1, с. 24—46.
2. Гершанович В. И. Биохимические и генетические основы переноса углеводов в бактериальную клетку. М., 1973.
3. Кочетков П. К., Божков А. Ф., Дмитриев Б. А., Усов А. И., Чижов О. С., Шибанов В. И. Химия углеводов. М., 1967.
4. Никольский И. И. Проницаемость клеток. — В кн.: Физиология пищеварения. Л., 1974, с. 7—25.
5. Никольский И. И., Трошин А. С. Транспорт сахаров через клеточные мембраны. Л., 1973.
6. Нуркс Е. Е., Зильбер Ю. Д., Уголев А. М. Влияние различных диет на всасывание в тонкой кишке свободной глюкозы и крахмала, образующейся при мембранном гидролизе мальтозы и крахмала. — ДАН СССР, 1971, т. 200, № 6, с. 1490—1492.
7. Писарева Л. И., Девелов Г. И. Влияние ряда поллектронитов на активность Na^+ - K^+ -АТФазы. — Цитология, 1973, т. 15, № 4, с. 415—422.
8. Смирнова Л. Ф., Уголев А. М. Некоторые особенности транспорта и аккумуляции глюкозы в слизистой тонкой кишки. — ДАН СССР, 1974, т. 245, № 1, с. 230—233.
9. Уголев А. М. Пристеночное (контактное) пищеварение. Л., 1963.
10. Уголев А. М. Мембранное пищеварение. Полисубстратные процессы, организация и регуляция. Л., 1972.
11. Уголев А. М., Жигуря Д. Р., Нуркс Е. Е. Аккумулярующий препарат слизистой — новый метод исследования начальных этапов переноса веществ через кишечную стенку. — Физиол. ж. СССР, 1970, т. 56, № 11, с. 1638—1641.
12. Уголев А. М., Матюшова И. М., Голите И. К. Методика изоляции эпителиальных клеток слизистой тонкой кишки. — Физиол. ж. СССР, 1969, т. 55, № 12, с. 1513—1517.
13. Файтельберг Р. О. Всасывание углеводов, белков и жиров в кишечнике. Л., 1967.
14. Файтельберг Р. О., Алексеева З. М. О механизме совместного всасывания глюкозы, глицина и хлористого натрия в тонком кишечнике собак. — Физиол. ж. СССР, 1966, т. 52, № 1, с. 91—98.
15. Alvarado F. The relationship between Na^+ and active transport of arbutin in the small intestine. — Biochim. et biophys. acta, 1965, v. 109, № 2, p. 478—494.
16. Alvarado F. D-xylose active transport in the hamster small intestine. — Biochim. et biophys. acta, 1966, v. 112, № 2, p. 292—306.
17. Alvarado F. Transport of sugars and amino acids in the intestine: evidence for a common carrier. — Science, 1966, v. 151, № 3713, p. 1010—1012.
18. Alvarado F. Amino-acid transport in hamster small intestine: site of inhibitor by D-galactose. — Nature, 1968, v. 219, № 5151, p. 276—277.
19. Alvarado F. Sodium activation of the sugar transport system in guinea pig small intestine: selective effect on the maximal transport velocity or on the Michaelis constant, depending on the sugar used as substrate. — Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem., 1972, Bd. 353, H. 1, S. 1—2.

39. Stirling C. E., Kinter W. B. High-resolution radioautography of galactose-³H accumulation in rings of hamster intestine. — *J. Cell Biol.*, 1967, v. 35, № 3, p. 585—604.
140. Swaminatham N., Eichholz A. Studies on the mechanism of active intestinal transport of glucose. — *Biochim. et biophys. acta*, 1973, v. 298, № 3, p. 724—731.
141. Taylor A. E., Wright E. M., Schultz S. G., Curran P. F. Effect of sugars on ion fluxes in intestine. — *Amer. J. Physiol.*, v. 214, № 4, p. 836—842.
142. Thomas L. Isolation of N-ethylmaleimide-labelled phlorizin-sensitive D-glucose binding protein of brush border membrane from rat kidney cortex. — *Biochim. et biophys. acta*, 1973, v. 291, № 2, p. 454—461.
143. Thomas L., Kinne R., Frohner P. P. N-ethylmaleimide labeling of a phlorizin-sensitive D-glucose binding site of brush border membrane from the rat kidney. — *Biochim. et biophys. acta*, 1972, v. 290, № 1, p. 125—133.
144. Torres-Pinedo R., Garcia-Castineras S., Alvarado F. False D-glucose binding to fractions of disrupted intestinal brush borders. — *Federat. Proc.*, 1972, v. 31, № 2, p. 239.
145. Vidaver G. A. Glycine transport by hemolyzed and restored pigeon red cells. — *Biochemistry*, 1964, v. 3, № 6, p. 795—798.
146. Weiser M. M., Isselbacher K. J. Phosphoenolpyruvate-activated phosphorylation of sugars by intestinal mucosa. — *Biochim. et biophys. acta*, 1970, № 3, p. 349—359.
147. Wilson T. H. Intestinal absorption. Philadelphia—London, 1962.
148. Wilson T. H., Landau B. R. Specificity of sugar transport by the intestine of the hamster. — *Amer. J. Physiol.*, 1960, v. 198, № 1, p. 99—102.
149. Wiseman G. Absorption from the intestine. London—N. Y., 1964.
150. Wright E. M. The origin of the glucose dependent increase in the potential difference across the tortoise small intestine. — *J. Physiol.*, 1966, v. 185, № 2, p. 486—500.

Глава 7

ВСАСЫВАНИЕ АМИНОКИСЛОТ

Р. И. Кушак

В процессе всасывания аминокислот, являющихся конечными продуктами гидролиза белковых молекул, так же как и во всасывании других соединений, можно выделить два момента, отличающихся как по механизму действия, так и по методам, используемым для их анализа: транспорт аминокислот из экстрацеллюлярной жидкости внутрь клеток тонкой кишки и поступление аминокислот из кишечных эпителиоцитов в кровяное русло. Интерес к проблеме всасывания аминокислот возник именно в связи с исследованием формы поступления белка в кровь, и лишь в середине 20-х годов исследователи серьезно заинтересовались транспортом аминокислот через плазматическую мембрану внутрь кишечных эпителиоцитов.

В настоящей главе основное внимание уделяется анализу механизмов, обеспечивающих поступление аминокислот через апикальную мембрану кишечных эпителиоцитов внутрь этих клеток. Учитывая принципиальную важность вопроса о форме поступления белкового азота через клеточную мембрану для локализации механизма транспорта аминокислот, необходимо также осветить проблему топографии механизмов, осуществляющих заключительные стадии гидролиза белковых молекул. Наряду с процессами пассивной и облегченной диффузии в главе уделяется внимание активному транспорту, являющемуся основным механизмом поступления аминокислот в клетки тонкой кишки. Анализ этого процесса включает также и классификацию переносчиков на основании изучения взаимодействия между аминокислотами при всасывании. Обращается внимание на возможность всасывания D-аминокислот против градиента концентрации, зависимость транспорта аминокислот от метаболической энергии и влияние на этот процесс электролитов и витаминов.

При обсуждении всех этих вопросов важное значение придается анализу основных кинетических констант транспортируемых аминокислот, характеризующих скорость процесса и средство аминокислоты к транспортному механизму. Транспорт аминокислот осуществляется лишь при наличии у этих соединений определенной стерической структуры, поэтому специальное внимание уделяется характеристике функциональных групп аминокислот, участвующих в образовании комплекса с переносчиком. Значительный интерес представляет изучение интенсивности транспорта аминокислот на разных стадиях онтогенетического развития животных и в различных отделах тонкой кишки. Наконец, сделана попытка обобщить данные, касающиеся возможности существования в кишечных эпителиоцитах транспортных систем, ответственных за выход аминокислот на базальном полюсе клетки и, таким образом, создать возможно полное представление об основных этапах всасывания аминокислот, связанных с их прохождением через слизистую оболочку тонкой кишки.

7.1. ФОРМА ПОСТУПЛЕНИЯ БЕЛКА В КРОВЬ

7.1.1. ИССЛЕДОВАНИЯ IN VIVO

До начала нынешнего столетия существовало мнение, что конечными продуктами гидролиза белка являются альбумозы и пептоны, представляющие собой продукты неполного белкового переваривания. В связи с этим полагали, что указанные соединения являются основной формой всасывания белковых молекул. Открытие эрипсина [107] — комплекса кишечных пептидаз, которому приписывали основную роль в гидролизе белка до аминокислот, а также обнаружение последних в кишечнике при переваривании белка способствовали формированию новой точки зрения, согласно которой аминокислоты, являющиеся конечными продуктами гидролиза белка, представляют собой основную форму всасывания белковых молекул. Эта гипотеза базировалась на таких экспериментальных наблюдениях, как наличие аминокислот в тонкой кишке при переваривании белка, возможность существования животных на диете, содержащей только гидролизованый белок, и способность организма использовать аминокислоты, введенные внутривенно [218, 224, 355]. Однако наряду с данными, свидетельствующими о всасывании аминокислот, не исключалась возможность поступления в плазму крови аминокислотных комплексов (пептидов), не являющихся белками или пептонами. В частности, Абдергальден [63] предполагал, что аминокислоты, образующиеся при гидролизе белка, проходя через кишечную стенку, синтезируются в белки крови, которые в свою очередь являются материалом для образования специфических белков тканей. Однако эта точка зрения оказалась ошибочной и была обусловлена отсутствием точных аналитических методов опре-

деления аминокислот в крови [331]. По мнению Фолина и Делиса [154], белки пищи поступают в кровь в виде свободных аминокислот и в таком виде доставляются к мышцам и другим тканям.

Первые экспериментальные данные, свидетельствующие о поступлении в кровь продуктов полного гидролиза белка, были получены Ван-Слайком и Мейером [331]. Применяя специально разработанный метод определения аминного азота, они показали, что уровень его в брыжеечной и периферической крови кошек после введения аланина или скармливания белка резко повышается. Несколько позднее Эбел и соавт. [64] с помощью метода диализа обнаружили повышение уровня свободных аминокислот (аланина, валина, гистидина) в крови животных после белковой нагрузки. Повышение уровня аминокислот в крови после приема белка отмечали также Фолин и Бергланд [153], Хит и Фалертон [175] в наблюдениях на людях и Болтон и Райт [86] в экспериментах на кошках. Обращает на себя внимание тот факт, что уровень аминного азота в крови людей [155] и в крови цыплят [201] был выше после орального введения гидролизата белка, чем интактного белка. На основании этих данных Фри и Леонард [155] делают вывод, что при переваривании белка лимитирующим фактором является не скорость его гидролиза, а интенсивность всасывания аминокислот.

Для выяснения вопроса о форме всасывания белка в крови после белковой нагрузки определяли не только уровень свободных аминокислот, но и концентрацию в ней пептидов. Кристенсен и соавт. [103] давали испытуемым желатину, содержащую много глицина (25.5%) и аланина (8.7%). После такой нагрузки в периферической крови не отмечали увеличения концентрации глицин- и аланинсодержащих пептидов.

Однако наряду с данными, указывающими на всасывание перевариваемого белка в виде аминокислот, имеются наблюдения, свидетельствующие о возможности поступления в кровь продуктов неполного гидролиза белка — пептидов [20]. Лондон и Кочнева [21] показали, что в период кишечного пищеварения в портальной крови появляются сложные аминокислотные комплексы — полипептиды, уровень которых возрастает параллельно концентрации белка в кишечном химусе. По мнению Лондона и Ловцкого [22], образующиеся пептиды могут служить блоками для синтеза специфических белков организма. Кайори [92], основываясь на низкой активности кишечного сока у собак, недостаточной для переваривания пептона до дипептидов и аминокислот, высказал предположение о том, что всасывание полипептидов в кровь может происходить или частично в нерасщепленной форме, или пептидазная активность связана с клетками слизистой оболочки тонкой кишки. Более вероятной представлялась вторая возможность, причем активность кишечного сока в этом случае он связывал с присутствием в нем десквамированных эпителиальных клеток слизистой оболочки.