

УДК 616.34 : 616-001./29

ХАРАКТЕРИСТИКИ ТРАНСПОРТА ГЛЮКОЗЫ И АЛАНИНА МЕМБРАННЫМИ ВЕЗИКУЛАМИ ЩЕТОЧНОЙ КАЕМКИ ТОНКОЙ КИШКИ КРЫС ПРИ ИНКОРПОРАЦИИ РАДИОНУКЛИДОВ

В.В. Воробьев

УО «Гродненский государственный медицинский университет»

Настоящее исследование посвящено оценке влияния длительного орального поступления радионуклидов на показатели мембранного транспорта некоторых нутриентов в тонкой кишке крыс.

Ключевые слова: кишечник, радионуклиды, мембранный транспорт, глюкоза, аланин.

The present study is aimed at the assessment of the impact of continuous oral entry of radioactive nuclides on membrane transport indices of some nutrients in rat small intestine.

Key words: intestine, radioactive nuclides, membrane transport, glucose, alanin.

Патобиохимические изменения в клетках кишечного эпителия являются одним из существенных элементов общего радиационного синдрома в условиях эндогенного и экзогенного облучения организма. В настоящее время имеется значительное количество данных, показывающих, что патологические изменения в тонком кишечнике занимают важное место в симптомокомплексе повреждений, развивающихся в организме при инкорпорации радионуклидов [4]. Эпидемиологические исследования свидетельствуют, что в структуре заболеваемости большой удельный вес занимают болезни органов пищеварения. Известно, что в условиях хронического орального поступления радиоактивных веществ происходит постоянное облучение тканей пищеварительного тракта. За счет продолжительности самого пищеварительно-всасывательного процесса, задержки и частичного депонирования радионуклидов в криптах, их печечно-кишечной циркуляции клетки тонкого кишечника подвергаются внутреннему облучению в значительной дозе, что может явиться причиной разнообразных морфофункциональных повреждений. При этом следует иметь в виду, что всеобъемлющая оценка возникающих нарушений, их динамика, патогенетические механизмы могут быть изучены при проведении соответствующих экспериментальных исследований [6]. Ранее в нашей лаборатории была дана оценка влияния инкорпорации радионуклидов на ферментативную активность тонкой кишки. По нашим данным, полученным в экспериментах на животных, длительное оральное поступление радионуклидов вызывает разнообразные перестройки структурно-функционального состояния различных отделов тонкой кишки. Отмечается значительное нарушение активности гидролитических ферментов – мальтазы, сахаразы, щелочной фосфатазы, гаммаглутамилтранспептидазы, изменяется их проксимально-дистальная топография [1], а также скорость транспорта галактозы и некоторых витаминов в изолированных отрезках кишечника [2].

Однако, рассматривая эти данные, следует учитывать, что эпителиальные клетки отличаются структурной и функциональной полярностью плазматической мембраны, в которой различают два участка – апикальную и базо-латеральную мембраны. Как известно, апикальная мембрана является местом расположения специфических пищеварительных ферментов и транспортных систем, обеспечивающих поглощение нутриентов из просвета кишечника. Базо-латеральная мембрана содержит Na^+ , K^+ -зависимую АТФ-азу, 5'-нуклеотидазу, транспортные системы, связывающие внутриклеточный и внеклеточный компартменты [7]. Эти принципиальные различия в функциональной биохимии мембран существенно затрудняют точную интерпретацию данных, полученных в экспериментах на фрагментах слизистой оболочки или на изолированных эпителиальных клетках кишечника. Решение проблемы может быть достигнуто благодаря применению методов получения обогащенных мембранных фракций и их использованию для изучения транспорта в сочетании с микрофилтрационной техникой [5, 7]. С целью ответа на вопрос, в какой степени выявленные ранее нарушения функциональной биохимии тонкой кишки связаны с радиационно-индуцированными изменениями апикальной мембраны, в данной работе определены особенности транспорта D – глюкозы и аланина мембранными везикулами щеточной каймы экспериментальных крыс.

Материал и методы

Опыты выполнены на белых беспородных крысах-самцах начальной массой 130-140 г, составивших 2 группы. Первая – контроль, получала в течение 45 дней обычное зерно вивария, вторая – опыт, получала радиоактивное зерно, содержащее ^{137}Cs (427,7 Бк/кг) и ^{90}Sr (97,7 Бк/кг). Показатели радиоактивности корма у контрольных животных были в 15-16 раз ниже. После предварительного 12-часового голодания животных забивали под легким эфирным наркозом, изолировали тощую

кишку и промывали ее холодным 0,9% NaCl. Мембраны щеточной каймы энтероцитов выделяли методом, описанным нами ранее [3]. Полученный препарат мембран отличался достаточно высокой степенью чистоты. Кратность обогащения, рассчитанная из значений удельной активности сахаразы, приближалась к 20. Транспорт изучали посредством быстрой микрофльтрационной техники [7], используя ^{14}C -глюкозу или аланин. Инкубацию проводили при 37°C , начиная с внесения 20 мкл суспензии везикул в 100 мкл инкубационного раствора. Состав последнего зависел от цели экспериментов, но всегда содержал 5 мМ Трис - Нерес, pH – 7,4, 100-200 мМ маннитол, 100 мМ NaCl и 1-80 мМ ^{14}C -глюкозу или 0,5-10 мМ ^{14}C -аланин. Процесс транспорта прекращали, добавляя 1 мл ледяного ($0-4^\circ\text{C}$) стоп-раствора (100 мМ маннитол, 5 мМ Трис - Нерес, pH – 7,4 и 100 мМ хлористый холин), смесь сразу фильтровали через нитроцеллюлозные фильтры фирмы «Сортирус» с размером пор 0,6 мкм. Фильтры промывали 5 мл стоп-раствора, просушивали и погружали в толуольный сцинтиллятор. Радиоактивность проб регистрировали на счетчике Марк - 2 (США). Белок определяли по методу Лоури и др. [8]. Математическую обработку результатов исследований выполняли на компьютере, используя пакет программ «Statistica 6.0» для «Windows».

Результаты и обсуждение

Всасывание глюкозы в тонкой кишке обеспечивается преимущественно Na^+ -зависимой системой транспорта [5]. Оценка этого механизма в наших исследованиях представлена на рисунке 1. В присутствии градиента Na^+ (снаружи – 100 мМ, внутри везикул – 0 мМ) транспорт был быстрым и линейным в начальный период инкубации, достигая максимальных значений в контрольной группе крыс – через 30 сек, а в опытной через 20 сек инкубации. Затем в обеих группах наблюдается обратный выход глюкозы с постепенным достижением равновесного состояния к 5 минуте инкубации везикул.

V, нмоль/мг белка

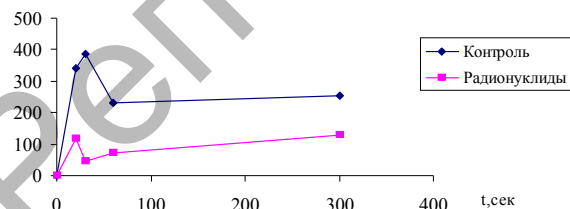


Рисунок 1 – Зависимость транспорта D-глюкозы мембранными везикулами щеточной каймы клеток тонкой кишки от продолжительности инкубации у контрольных и получавших радионуклиды крыс

Однако, как свидетельствуют данные (рисунок 1), наблюдаемое превышение равновесного состояния, так называемый «овершут» для мембранных везикул щеточной каймы кишечника контрольных крыс отличается значимо более высокими показателями накопления глюкозы в сравнении с жи-

вотными, получавшими радионуклиды. Далее была исследована зависимость начальной скорости транспорта D-глюкозы от ее концентрации в инкубационной среде. Натрий, стимулируемый транспорт глюкозы в мембранных везикулах щеточной каймы двух групп животных, стремился к насыщению при изменении концентрации субстрата от 5 до 80 ммоль/л и удовлетворял кинетике Михаэлиса-Ментен. Вместе с тем, кривая этой зависимости при инкорпорации радионуклидов имела более низкие абсолютные значения скорости транспорта глюкозы. При определении кинетических параметров был применен метод Эди-Хофсти. Рассчитанные таким методом характеристики транспорта равны, соответственно: K_t – 38,5 мМ (контроль) и 35,7 мМ (радионуклиды), $V_{\max}$ – 222,4 нмоль/мин/мг белка (контроль) и 117,6 нмоль/мин/мг белка (радионуклиды).

Известно, что в тонком кишечнике имеются 2 системы транспорта глюкозы, с высоким и низким сродством к углеводу [7]. Перенос моносахаридов через щеточную каемку энтероцитов является натрий-сопряженным, электрогенным процессом и опосредуется высокоспецифическими переносчиками, не способными переносить другие сахара [7].

Полученные результаты свидетельствуют, что длительное энтеральное поступление радионуклидов вызывает уменьшение скорости Na^+ -зависимого транспорта глюкозы в мембранных везикулах щеточной каймы кишечника. Снижение $V_{\max}$ транспорта и отсутствие изменений K_t указывает на уменьшение числа специфических переносчиков моносахарида в апикальной мембране энтероцитов, без влияния на свойства транспортера.

Во второй серии опытов изучены параметры мембранного транспорта аланина. В таблице 1 представлены данные, показывающие, что поглощение ^{14}C -аланина мембранными везикулами тонкой кишки в начальный период времени (20-30 сек) быстро нарастает. Максимальное превышение равновесного состояния в присутствии ионов натрия наблюдается на 30 сек инкубации. Однако при оральном поступлении радионуклидов мембранные везикулы демонстрируют существенно меньшие способности транспортировать ^{14}C -аланин ($P < 0,01$). Далее, в процессе удлинения инкубационного времени наблюдается обратный выход аминокислоты и постепенно, в течение 5 минут инкубации устанавливается равновесное состояние, как

Таблица 1 – Зависимость натрийзависимого транспорта ^{14}C -аланина в мембранных везикулах щеточной каймы тонкой кишки от продолжительности инкубации

Время инкубации	Транспорт ^{14}C -аланина, нмоль/мг белка		P
	Контроль	Радионуклиды	
20 сек	$80,3 \pm 3,5$	$59,5 \pm 10,3$	$> 0,05$
30 сек	$125,6 \pm 4,6$	$92,5 \pm 4,8$	$< 0,01$
1 мин	$101,3 \pm 25,1$	$65,4 \pm 5,1$	$> 0,1$
5 мин	$99,1 \pm 30,1$	$71,5 \pm 4,8$	$> 0,5$

в контроле, так и в опыте. При этом исчезают достоверные различия между показателями поглощения ^{14}C -аланина в контрольной и опытной группах.

Результаты изучения кинетики поглощения ^{14}C -аланина представлены в таблице 2. Эти данные свидетельствуют, что с увеличением концентрации аминокислоты скорость транспорта достигает насыщения, и соответствуют литературным сведениям об активном транспорте аланина.

Таблица 2 – Зависимость скорости натрийзависимого транспорта ^{14}C -аланина в мембранных везикулах щеточной каемки тонкой кишки от его концентрации

Концентрация ^{14}C -аланина, мМ	Скорость транспорта, нмоль/20 сек/мг белка		Р
	Контроль	Радионуклиды	
0,5	80,3 ± 3,5	59,5 ± 10,3	> 0,05
2	139,0 ± 11,3	93,2 ± 6,0	< 0,05
5	255,1 ± 8,9	166,6 ± 43,9	> 0,05
10	480,9 ± 109,1	258,3 ± 7,9	< 0,05

Заключение

Для оценки влияния радионуклидов на свойства переносчика аланина в щеточной каемке, обеспечивающего, как известно, всасывание многих нейтральных аминокислот, проведен кинетический анализ результатов исследования методом Эдди-Хофсти. Установлено, что в контрольной группе K_m и V_{max} транспорта равны соответственно 0,74 мМ и 81,2 нмоль/20 сек/мг белка. При 45-дневном поступлении радионуклидов изменяются характеристики этой транспортной системы в щеточной каемке энтероцитов, обеспечивающей всасывание нейтральных аминокислот. На это указывает уменьшение кинетических параметров транспорта ^{14}C -аланина в опытной группе. Показатели K_m и V_{max} соответственно равны 0,58 мМ и 62,5 нмоль/20сек/мг белка.

Таким образом, длительное оральное поступление радионуклидов приводит к снижению количества транспортеров глюкозы и аланина в щеточной каемке тонкой кишки. Эти изменения кинетических характеристик транспорта субстратов от-

ражают перестройки структурно-функциональных свойств апикальной мембраны эпителиальных клеток, вызванные длительным эндогенным облучением и могут рассматриваться как доказательство уменьшенных всасывательных способностей энтероцитов. Результаты исследования указывают на важную роль нарушений мембранного транспорта нутриентов в развитии функциональных поражений тонкого кишечника при воздействии малых доз радиации.

Литература

1. Воробьев, В.В. Проксимальнодистальная топография кишечных гидролаз при энтеральном поступлении радионуклидов / В.В. Воробьев, В.В. Лелевич // Медицинские новости. – 1999. – № 7. – С. 44-46.
2. Воробьев, В.В. Мембранный транспорт некоторых нутриентов в тонкой кишке крыс при энтеральном поступлении радионуклидов / В.В. Воробьев // Материалы междунар. науч.-практ. конф. – Гомель, 2000. – С. 98-100.
3. Воробьев, В.В. Поглощение пантотеновой кислоты мембранными везикулами щеточной каймы тонкого кишечника крыс / В.В. Воробьев, А.Г. Мойсеенок // Известия НАН Беларуси. – 1996. – С. 80-84.
4. Сосновская, Е.Я. Состояние здоровья населения Республики Беларусь, пострадавшего от катастрофы на Чернобыльской АЭС / Е.Я. Сосновская. – Гомель: ГУ РНПЦ РМ и ЭЧ, 2006. – 250 с.
5. Bowman, B.B. Epithelial transport of water - soluble vitamins / B.B. Bowman // Annu. Rev. – 1989. – Vol. 9. – P. 187-189.
6. Effect of external abdominal irradiation on intestinal morphology and brush border membrane enzyme and lipid composition / M. Keelan [et al.] // Radiation Research. – 1986. – Vol. 105. – P. 84-98.
7. Glucose Transport in isolated brush border membrane from rat small intestine / U. Hopfer [et al.] // J. Biol. Chem. – 1973. – Vol. 248, № 1. – P. 25-32.
8. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O.M. Lowry [et al.] // J. Biol. Chem. – 1951. – Vol. 3. – P. 265-275.

Summary

CHARACTERISTICS OF GLUCOSE AND ALANIN TRANSPORT MEDIATED BY BRUSH BORDER MEMBRANE VESICLES IN RAT SMALL INTESTINE UNDER RADIOACTIVE NUCLIDES INCORPORATION

V.V. Vorobiov

Grodno State Medical University

In experiments on rats we have determined that oral 45-day entry of radioactive nuclides causes essential changes in characteristics of glucose and alanin membrane transport in rat small intestine. The results of the study indicate an important role of the impairment of nutrient membrane transport in intestinal pathology development at small doses of radiation.

Поступила 12.12.07