

УДК 577.15:591.1

В. М. Гусев, А. А. Груздков, А. М. Уголев

НЕПЕРЕМЕШИВАЕМЫЕ ПРЕМЕМБРАННЫЕ СЛОИ

В настоящее время для интерпретации взаимоотношений тканей и клеток с окружающими средами все большее значение приобретает концепция перемешиваемых слоев, то есть стационарных слоев жидкости на поверхности биологической мембраны, обладающих определенным диффузионным сопротивлением для потока веществ к мембране. Первоначально возникшая в гастроэнтерологии, эта концепция теперь используется очень широко в разных областях биологии и медицины. Однако, несмотря на то, что представление о перемешиваемых слоях оказалось весьма полезным и плодотворным, имеются серьезные основания для критического пересмотра ряда устоявшихся положений.

Цель настоящей статьи состоит в критическом рассмотрении некоторых аспектов этой концепции и оценке (на примере эпителия тонкой кишки) роли зависимых от клеток потоков жидкости, а также геометрии клеточных поверхностей в модификации влияния перемешиваемых слоев на процессы ферментативного гидролиза и активного транспорта различных веществ.

Современные представления о перемешиваемых слоях. Нормальное протекание мембранного гидролиза и всасывания пищевых веществ в тонкой кишке требует, как известно, непрерывного поступления исходных субстратов из полости кишки, или объемной фазы, на поверхность клеточной мембраны, где сосредоточены соответствующие ферменты и системы активного (или пассивного) транспорта веществ через апикальную мембрану энтероцита.

Ранее считалось, что обмен субстратами между полостью кишки и структурами ее поверхности в достаточной степени обеспечивается конвективными потоками, которые создаются в объемной фазе за счет моторики кишки и движения ворсинок (в условиях *in vivo*) или за счет принудительного перемешивания объемной фазы (в условиях *in vitro*). Поэтому при исследовании всасывания в тонкой кишке предполагалось, что полученные в эксперименте значения кинетических параметров, описывающих, например, активный транспорт какого-либо вещества, непосредственно отражают свойства самой транспортной системы.

Однако в последние годы внимание исследователей привлекла проблема перемембранных слоев жидкости, которые, как выяснилось, существенно влияют на обмен субстратами между клетками и внеклеточной средой, подчас до неузнаваемости меняя те характеристики процессов (например, кинетические параметры гидролиза или транспорта), которые обычно приписываются самим клеткам. Некоторые факты и закономерности, касающиеся этой проблемы, в настоящее время считаются установленными [1, 3, 5, 11, 12, 16, 19, 20, 22].

Между поверхностью липопротеиновой клеточной мембраны и объемной фазой существует переходный слой — так называемый перемешиваемый водный слой, где перемещение вещества определяется не конвективными потоками жидкости, а законами простой диффузии (рис. 1).

Концентрация веществ, подвергающихся мембранному гидролизу или всасыванию, может существенно снижаться в направлении от объемной фазы к поверхности мембраны (рис. 1), что зависит от соот-

ношения скорости гидролиза или транспорта и скорости диффузии, определяемой диффузионным сопротивлением неперемешиваемого слоя.

Диффузионное сопротивление неперемешиваемого водного слоя зависит от его толщины, а также от константы диффузии для данного вещества. Толщина этого слоя, определенная с применением различных экспериментальных и теоретических подходов [8, 13, 14, 16, 19, 20], оценивается величиной порядка 100—300 мкм для условий *in vitro* и 500—1000 мкм для условий *in vivo*.

Определяемые по экспериментальным данным значения кинетических констант для мембранного гидролиза или транспорта — так называемые «кажущиеся» значения K_M (константы Михаэлиса) и V

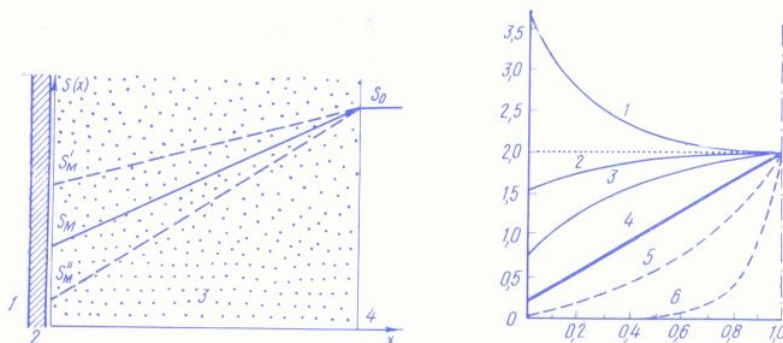


Рис. 1. Схематическое представление ферментативно-транспортной поверхности с неперемешиваемым слоем.

1 — внутриклеточная среда; 2 — апикальная мембрана; 3 — неперемешиваемый слой; 4 — объемная фаза. S_0 — концентрация субстрата в объемной фазе; S'_M , S_M , и S''_M — концентрации субстрата на поверхности мембраны при $\frac{V'}{D'} < \frac{V}{D} < \frac{D''}{V''}$ соответственно, где V — максимальная скорость гидролиза (или активного транспорта); D — константа диффузии для данного субстрата.

Рис. 2. Влияние скорости трансмембранного потока воды на распределение концентрации субстрата в автономном премембранном слое.

По горизонтали — относительное расстояние от мембраны (толщина премембранного слоя принята за 1); по вертикали — концентрация субстрата в премембранном слое (ммоль·л⁻¹). Кривые 1—6 соответствуют следующим скоростям трансмембранных потоков воды: 4к, 3к, 2к, 0, —2к, —8к, где $k=1,67 \cdot 10^{-4}$ см·с⁻¹. Остальные параметры: константа диффузии $D=5 \cdot 10^{-6}$ см²·с⁻¹; толщина премембранного слоя $d=3 \cdot 10^{-2}$ см; константа Михаэлиса $K_M=1$ ммоль·л⁻¹; максимальная скорость транспорта $V=1,67 \cdot 10^{-6}$ ммоль·см⁻²·с⁻¹.

(максимальной скорости гидролиза или транспорта) являются в сущности физиологическими параметрами, зависящими от условий эксперимента, и могут весьма существенно отличаться от «истинных» значений этих констант [5, 11].

Существование диффузионного сопротивления неперемешиваемого слоя делает некорректным применение уравнения Михаэлиса — Ментен и его линейных преобразований для определения «истинных» значений кинетических констант (K_M и V) мембранного гидролиза или активного транспорта веществ; его использование может привести к значительным ошибкам в оценке указанных констант [9, 15, 16, 17, 19].

Как показали многочисленные экспериментальные исследования последних лет, учет неперемешиваемого слоя оказался необходимым для понимания не только физиологии, но и патологии гидролитических и транспортных процессов в тонкой кишке [10, 14, 17, 18, 21].

Вместе с тем анализ обширного экспериментального материала и ряда противоречивых фактов говорит о необходимости внесения определенных поправок в современную концепцию неперемешиваемых слоев.

Критика современной концепции неперемешиваемых слоев. С точки зрения физической химии неперемешиваемые слои — это слои, возникающие вследствие взаимодействия между собой молекул воды и молекул поверхности мембраны и первоначально рассматривавшиеся как

адгезионные. Теория неперемешиваемых слоев в динамических системах с межмолекулярными взаимодействиями имеет толщину, определяемую толщиной слоя воды, имеющего толщину, определяемую на препаратах, означал бы существование воды, что трудно объяснить гидродинамикой.

Не менее неожиданно, что основным назначением неперемешиваемого слоя является то, чтобы из-за селективности, определенной диффузионными процессами, не увеличивая скорости транспорта [7]. Однако отклонение неперемешиваемого слоя от ожидаемого результата, эффективность процессов транспорта.

В определенной степени обстоятельство, что толщина неперемешиваемого слоя *in vivo*, оказывается значительной, что должно было бы означать замедление мембранного гидролиза и транспорта, что обычно основные свойства *in vitro*, значительно ухудшаются в функционирующей мембране.

Некоторые слабости слоев проявляются и при рассмотрении пищеварительно-транспортных процессов. С одной стороны, считается, что в тонкой кишке складок и т. п. в тонкой кишке резко повышено эффективное количество процессов, благодаря значительной функционирующей поверхности кишечника у холоднокровных животных, анализируя результаты деления, пришли к выводу, что поверхность тонкой кишки совпадает с площадью цищек ворсинок для пассивного транспорта, составляющей 1/60 от площади липопротранспортируемых веществ, что совпадает с площадью поверхности ворсинок как с площадью премембранного слоя и лишь частично с площадью мембраны. Нетрудно понять, что в направлении пересмотра концепции значения апикальной и транспортных активностей.

Наконец, общепринятая концепция статической и неучет потоков воды, которые, как показывают условия мембраны.

Концепция автономного премембранного слоя. Суть рассматриваемой концепции, рассмотренной нами ранее [2, 3], состоит в том, что расположенный между объектами и средой не является

адгезионные. Теория неперемешиваемых слоев и в макро-, и в микродинамических системах связана с явлениями внутреннего трения и межмолекулярных взаимодействий. Если принять, что мономолекулярный слой воды имеет толщину порядка нескольких ангстрем, то неперемешиваемый слой толщиной 100—300 мкм, экспериментально определяемый на препаратах *in vitro* с интенсивным перемешиванием, означал бы существование около 10^6 неподвижных мономерных слоев воды, что трудно объяснимо с точки зрения молекулярной физики и гидродинамики.

Не менее неожиданно и трудно объяснимо наличие неперемешиваемого слоя столь большой толщины с общебиологических позиций. Действительно, основное назначение активно транспортирующих систем состоит в том, чтобы из сильно разбавленных растворов извлекать, и притом селективно, определенные вещества. Эволюция шла по линии замены диффузионных процессов процессами активного транспорта, а также увеличения сродства, и как следствие, возрастания эффективности транспорта [7]. Однако относительно высокое диффузионное сопротивление неперемешиваемого слоя, по-видимому, приводит к прямо противоположному результату, резко снижая «кажущееся» сродство и эффективность процессов транспорта.

В определенной степени парадоксальным является также то обстоятельство, что толщина неперемешиваемого слоя, определяемая *in vivo*, оказывается значительно больше, чем при определении *in vitro*, что должно было бы означать существенное снижение эффективности мембранного гидролиза и транспорта. Вместе с тем хорошо известно, что обычно основные свойства биологических систем, определяемые *in vitro*, значительно ухудшаются по сравнению с выявляемыми в нормально функционирующей системе *in vivo*.

Некоторые слабости современной концепции неперемешиваемых слоев проявляются и при рассмотрении роли геометрических особенностей пищеварительно-всасывательной поверхности тонкой кишки. С одной стороны, считается общепризнанным, что появление ворсинок, складок и т. п. в тонкой кишке теплокровных животных способствует резкому повышению эффективности гидролитических и транспортных процессов, благодаря значительному (в 7—10 раз) увеличению площади функционирующей поверхности по сравнению с гладкой поверхностью кишки у холоднокровных животных. С другой стороны, ряд авторов, анализируя результаты экспериментов и математического моделирования, пришли к выводу о том, что эффективная всасывательная поверхность тонкой кишки млекопитающих мало отличается или почти совпадает с площадью цилиндрической поверхности на уровне верхушек ворсинок для пассивно всасываемых молекул и составляет только 1/60 от площади липопротеиновой клеточной мембраны для активно транспортируемых веществ [20, 22]. Другими словами, латеральные поверхности ворсинок как бы «экранированы» неперемешиваемым слоем и лишь частично выполняют пищеварительно-всасывательные функции. Нетрудно понять, что такая концепция является шагом в направлении пересмотра физиологической роли ворсинок кишечной слизистой и значения апикально-крипталных градиентов ферментативных и транспортных активностей.

Наконец, общепринятая концепция неперемешиваемых слоев является статической и не учитывает существования трансэпителиальных потоков воды, которые, как будет показано ниже, существенно модифицируют условия мембранного гидролиза и транспорта.

Концепция автономного премембранного слоя. Динамическая модель. Суть рассматриваемой здесь концепции, впервые обсуждавшейся нами ранее [2, 3], состоит в том, что неперемешиваемый водный слой, расположенный между объемной фазой и клеточной поверхностью, в действительности не является чисто диффузионной зоной вследствие су-

ществования потоков воды, направленных в клетку и из клетки, и, по-видимому, более корректно может быть охарактеризован как автономный премембранный слой.

Результирующий поток (J) исходного субстрата через этот слой в общем случае представляет собой сумму двух потоков, один из которых обусловлен диффузией (J_D), а другой — переносом вещества с потоком воды (J_W): $J = J_D + J_W$. При этом неперемешиваемый слой в

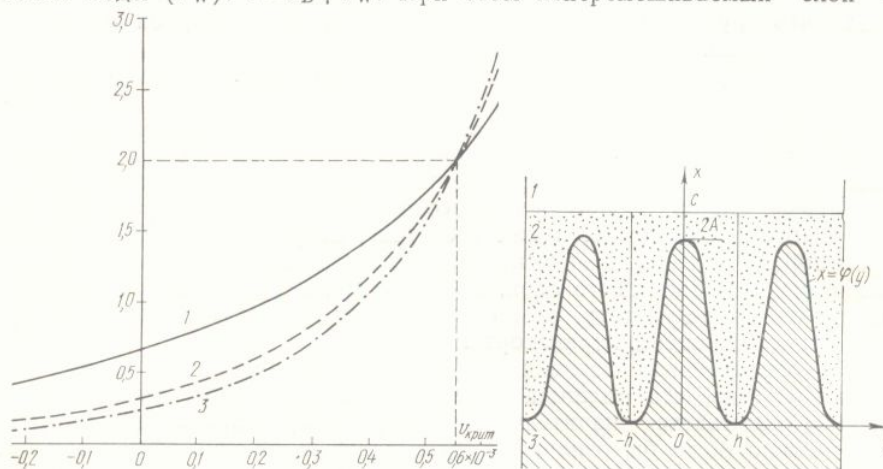


Рис. 3. Влияние скорости трансмембранного потока воды на концентрацию субстрата на мембране.

По горизонтали — линейная скорость потока воды ($\text{см} \cdot \text{с}^{-1}$); по оси ординат — концентрация субстрата на мембране (ммоль). Кривые 1, 2 и 3 соответствуют толщине премембранного слоя, равной 0, 0,01 и 0,02 см. Данные получены при следующих значениях параметров модели: константа диффузии $D = 5 \cdot 10^{-6} \text{ см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$; константа Михаэлиса $K_t = 1 \text{ ммоль}$; максимальная скорость транспорта $V = 1,67 \cdot 10^{-6} \text{ ммоль} \cdot \text{см}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$.

Рис. 4. Схематическое изображение складчатой поверхности как аналога поверхности слизистой тонкой кишки.

1 — объемная фаза (полость кишки); 2 — область неперемешиваемого слоя; 3 — область складок (ворсинок). Исследование модели проводилось для функции $x = \varphi(y) = A(1 + \cos \frac{\pi}{h} y)$ при $A = 0,05 \text{ см}$, $h = 0,03 \text{ см}$, $c = 0,105 \text{ см}$.

общепринятом понимании (как зона простой диффузии) является лишь частным и, вероятно, крайне редким состоянием автономного премембранного слоя при результирующем транспицитарном потоке воды равном нулю, то есть $J = J_D$.

Подробное математическое описание динамической модели активного транспорта через мембрану с учетом автономного премембранного слоя было дано нами ранее [2, 3]. В частности, было показано, что пространственное распределение концентрации субстрата в автономном премембранном слое описывается следующим уравнением:

$$s(x) = S_1 - \left(S_2 - \frac{V}{v} \frac{S_2}{K_t + S_2} \right) \left[\exp\left(-\frac{v}{D} d\right) - \exp\left(-\frac{v}{D} x\right) \right],$$

где S_1 и S_2 — концентрации субстрата в объемной фазе и на поверхности резорбирующей мембраны соответственно; D — константа диффузии для данного субстрата; K_t — константа Михаэлиса для транспорта; V — максимальная скорость транспорта; v — результирующая скорость трансмембранного потока воды; d — толщина автономного премембранного слоя.

Связь между S_1 и S_2 определяется выражением:

$$S_2 = S_1 \exp\left(\frac{v}{D} d\right) - \frac{V}{v} \frac{S_2}{K_t + S_2} \left[\exp\left(\frac{v}{D} d\right) - 1 \right].$$

Исследование данной модели показывает, что потоки воды делятся исходного субстрата. В частности, как покажут, что потоки воды, приводя к своей очереди отражению в величине «кажущейся» (K_t). В то же время «направленный из клетки» эффекты (рис. 2).

Проведенный нами анализ выявляет некоторые новые особенности концентрации субстрата трансмембранных в щины автономного премембранного слоя.

Как можно видеть, проявляется при максимальной скорости потока всасывания $v_{\text{крит}}$, концентрация субстрата транспорта (I) теоретически автономного премембранного слоя в большей степени в случае может быть определено из

$$\frac{V \cdot S_2}{K_t + S_2} - v S_2$$

Например, при $V = 1,67 \cdot 10^{-6} \text{ ммоль} \cdot \text{см}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$, $v_{\text{крит}} = 0,55 \cdot 10^{-3} \text{ см/с}$.

Вероятно, в реальности от $v_{\text{крит}}$. Однако при V и увеличении S_2 подмембранного пространства, не исключена возможность диффузионного сопоставления, что ведет не к снижению, а к усилению процесса.

Анализ динамической модели показывает, что важными для понимания процессов в тонком эпителии. Одной из задач, заключающейся в том, чтобы потоки воды по трансмембранной поверхности. При определении водных потоков, направленных в внутреннюю среду.

Другой механизм — автономный премембранный слой, который может быть по величине, но разный.

В этом случае создание различных веществ с различными значениями их констант связывания субстрата (например, вешивается обратным проникновением на мембрану молекул — исключается).

Таким образом, можно сказать, что гомеостатическое регулирование возможно не только в ферментативном, но и в регуляции транспорта.

Исследование данной динамической модели позволило продемонстрировать, что потоки воды могут существенно изменять характер распределения исходного субстрата в автономном премембранном слое. В частности, как показано на рис. 2, потоки воды, направленные внутрь клетки, приводят к повышению концентрации субстрата, что в свою очередь отражается на усилении активного транспорта и снижении величины «кажущейся» константы Михаэлиса для транспорта (K_t). В то же время «секреция» воды, то есть трансмембранный поток, направленный из клетки в объемную фазу, вызывает противоположные эффекты (рис. 2).

Проведенный нами дальнейший анализ динамической модели выявил некоторые новые закономерности. На рис. 3 показана зависимость концентрации субстрата на мембране от направления и величины трансмембранных водных потоков при различных значениях толщины автономного премембранного слоя.

Как можно видеть, влияние водных потоков в наибольшей степени проявляется при максимальной толщине слоя. При некоторой величине скорости потока всасывающейся воды, условно обозначенной нами $v_{\text{крит}}$, концентрация субстрата на мембране (S_2) и скорость активного транспорта (I) теоретически оказываются независимыми от толщины автономного премембранного слоя, а при $v > v_{\text{крит}}$ они возрастают в большей степени в случае слоя большей толщины. Значение $v_{\text{крит}}$ может быть определено исходя из условия $S_1 = S_2$, т. е.

$$\frac{V \cdot S_2}{K_t + S_2} - v S_2 = 0, \text{ откуда } v_{\text{крит}} = \frac{V}{K_t + S_2}.$$

Например, при $V = 1,67 \cdot 10^{-6}$ ммоль/см²/с; $K_t = 1$ ммоль/л и $S_2 = 2$ ммоль/л, $v_{\text{крит}} = 0,55 \cdot 10^{-3}$ см/с.

Вероятно, в реальной кишке скорости всасывания воды обычно далеки от $v_{\text{крит}}$. Однако при определенных условиях, например снижении V и увеличении S_2 под влиянием тех или иных факторов, по-видимому, не исключена возможность работы в таком режиме, когда увеличение диффузионного сопротивления премембранного слоя жидкости приведет не к снижению, а к повышению эффективности транспортно процесса.

Анализ динамической модели дал возможность выявить два механизма, важных для понимания барьерных и нутритивных функций кишечного эпителия. Один из них — механизм гидродинамической защиты, заключается в том, что при достаточно интенсивных секреторирующих потоках воды поступление исследуемого субстрата к транспортирующей мембране резко снижается или даже полностью прекращается. При определенных патологических условиях существование водных потоков, направленных из клетки, вероятно, обеспечивает защиту внутренней среды организма от проникновения вредных веществ.

Другой механизм — гомеостатирования потока субстрата через автономный премембранный слой — предполагает возможность равенства по величине, но разнонаправленности потоков J_D и J_W , т. е. $J_D = -J_W$.

В этом случае создаются условия для избирательного проникновения различных веществ к поверхности мембраны в соответствии со значениями их констант диффузии. В частности, если скорость переноса субстрата (например, димеров), обусловленная диффузией, уравновешивается обратным потоком воды, то это означает, что селективное проникновение на мембрану мономеров сохраняется, а более крупных молекул — исключается.

Таким образом, динамическая модель позволяет продемонстрировать, что гомеостатирование процессов мембранного гидролиза и всасывания возможно не только посредством регулирования соответствующих ферментативных и транспортных активностей, но и путем регулирования трансмембранных потоков воды.

Важная роль трансэпителиальных водных потоков в обмене субстратами между полостью тонкой кишки и ее пищеварительно-всасывательной поверхностью получила недавно и экспериментальное подтверждение [13].

Следует, однако, отметить, что рассмотренная здесь динамическая модель страдает тем недостатком, что в ней, как и в большинстве других моделей, касающихся проблемы неперемешиваемых слоев, не учитывались особенности геометрии кишечной поверхности.

Геометрия кишечной поверхности и проблема неперемешиваемых слоев. Существование в тонкой кишке млекопитающих развитых складок или ворсинок различной формы (в зависимости от вида животных) является одной из характерных особенностей геометрии кишечной поверхности. В разработанной нами математической модели в качестве удобной аппроксимации была принята складчатая поверхность, имеющая в сечении вид синусоиды с варьируемыми параметрами: амплитудой A и периодом $2h$ (рис. 4). При этом сопоставлялись два случая: а) с высотой складки $2A=0,1$ см и ее шириной в основании $2h=0,06$ см; б) высотой складки $2A=0,002$ см и шириной в основании $2h=0,06$ см, что соответствует практически плоской поверхности.

Мы предположили, что рассматриваемые поверхности обладают системой активного транспорта, характеризующейся кинетикой с насыщением, т. е. $J = \frac{V \cdot S}{K_1 + S}$, где S — концентрация транспортируемого субстрата на мембране, а остальные обозначения соответствуют приведенным выше.

Для удобства сопоставления складчатой и плоской поверхностей значения всех параметров, кроме высоты складки, задали идентичными для обоих вариантов модели.

Кроме того, в модели задано, что между складками поверхности, которые в первом приближении могут рассматриваться как аналоги кишечных ворсинок, а также над складками существует неперемешиваемый слой, через который исследуемое вещество перемещается в соответствии с законами простой диффузии. Толщина его определяется выражением $c=2A+d$, где $d=0,005$ см — толщина неперемешиваемого слоя над вершиной складки.

Перенос вещества через диффузионную зону в стационарном режиме может быть описан решением следующего уравнения: $D \left(\frac{\partial^2 S}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 S}{\partial y^2} \right) = 0$ в ограниченной области $x \in [0, c]$, $y \in [0, h]$ при следующих граничных условиях: $S(x, y)|_{x=c} = S_0 = \text{const}$; $\frac{\partial S(x, y)}{\partial y} \Big|_{y=h} = 0$; $\frac{\partial S(x, y)}{\partial y} \Big|_{y=0} = 0$; и $\frac{\partial S(x, y)}{\partial n} \Big|_{x,y \in \Phi} = \frac{bS(x, y)}{K_1 + S(x, y)} \Big|_{x,y \in \Phi}$, где $b = \frac{V}{D}$, V — максимальная скорость транспорта, D — коэффициент диффузии, n — нормаль к поверхности складки, задаваемой функцией $x = \varphi(y)$, $c = 2A + d$.

Подробное описание численной реализации модели на ЭВМ дано в приложении.

Рассмотрим полученные результаты. На рис. 5 представлена полученная на модели зависимость скорости транспорта через мембрану от концентрации субстрата в объемной фазе. Кривая 1 соответствует складчатой поверхности с соотношением высоты складки («ворсинки») к ее ширине у основания, равным 5:3. Кривая 2 соответствует случаю плоской поверхности.

Как можно видеть, при низких концентрациях субстрата скорости транспорта через складчатую и через плоскую поверхности близки, несмотря на то, что площадь последней в 3 раза меньше. Таким обра-

зом, если предположить, что ворсинчатой поверхности [что в случае низких концесимация сложной поверхности, проходящей вблизи допустимой.

Вместе с тем по мере ляются все большие разл



Рис. 5. Сопоставление скорости плоской (2) поверх

По горизонтали — концентрация суб(бе); по вертикали — скорость трансшей в основании складки (при $x=$ чениях параметров модели: кон $K_1=2$ ммоль·л⁻¹; толщина непереме ки 1) 0,1 см; 2) 0,002 см; максим поверхности, проходящей в осн 2) $0,1 \cdot 10^{-6}$ мм

поверхностей. Это связан транспортных мощностей во все большей степени тогда как в случае плоского процесса одинакова по в можно предположить, что ных поверхностей ворси спортивных процессах в зне смириваемого субстрата фективная поверхность ваться. При этом средн роль своего рода «резер

Сопоставление привк придти к выводу о возм ний толщины неперемеш риментальных исследова выражением [11] для оп в модификации Смитсона

где d — толщина неперемешиваемого слоя; K_1 и K_2 — «кажущаяся» константа, характеризующая скорость транспорта; D — коэффициент диффузии.

зом, если предположить, что сходные закономерности справедливы для ворсинчатой поверхности реальной тонкой кишки, то следует признать, что в случае низких концентраций транспортируемого субстрата аппроксимация сложной поверхности кишки гладкой цилиндрической поверхностью, проходящей вблизи вершущек ворсинок [20, 22], представляется допустимой.

Вместе с тем по мере повышения концентрации субстрата проявляются все большие различия между двумя типами рассматриваемых

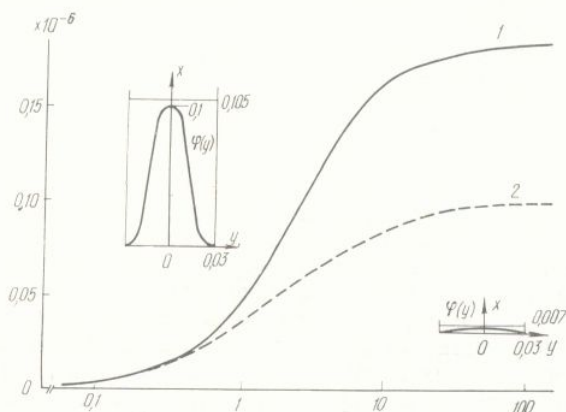


Рис. 5. Сопоставление скоростей транспорта субстрата на моделях складчатой (1) и плоской (2) поверхностей с учетом неперемешиваемого слоя.

По горизонтали — концентрация субстрата в объемной фазе (ммоль·л⁻¹) (в логарифмическом масштабе); по вертикали — скорость транспорта, выраженная на единицу площади поверхности, проходящей в основании складки (при $x=0$), (ммоль·см⁻²·с⁻¹). Данные получены при следующих значениях параметров модели: константа диффузии $D=5 \cdot 10^{-6}$ см²·с⁻¹; константа Михаэлиса $K_1=2$ ммоль·л⁻¹; толщина неперемешиваемого слоя над вершущей складки $d=0,005$ см; высота складки 1) 0,1 см; 2) 0,002 см; максимальная скорость транспорта, выраженная на единицу площади поверхности, проходящей в основании складки (при $x=0$): 1) $0,3 \cdot 10^{-6}$ ммоль·см⁻²·с⁻¹, 2) $0,1 \cdot 10^{-6}$ ммоль·см⁻²·с⁻¹; ширина складки — $2h=0,06$ см.

поверхностей. Это связано с тем, что по мере насыщения субстратом транспортных мощностей на вершущках складок в процесс транспорта во все большей степени вовлекаются боковые поверхности складок, тогда как в случае плоской мембраны интенсивность транспортного процесса одинакова по всей поверхности. Анализируя эти результаты, можно предположить, что в реальной кишке степень участия латеральных поверхностей ворсинок в интенсивных гидролитических и транспортных процессах в значительной мере зависит от концентрации рассматриваемого субстрата в полости кишки, и при ее увеличении эффективная поверхность функционирующей мембраны будет увеличиваться. При этом средняя и крипальная области ворсинок играют роль своего рода «резервной зоны» кишечной поверхности.

Сопоставление приведенных на рис. 5 кривых позволяет также прийти к выводу о возможной причине получения завышенных значений толщины неперемешиваемого слоя при ее расчете по данным экспериментальных исследований. В самом деле, воспользуемся известным выражением [11] для определения толщины неперемешиваемого слоя в модификации Смитсона с соавт. [14]:

$$d = \frac{(K_1 - K_2) D}{0,5 V}, \quad (1)$$

где d — толщина неперемешиваемого водного слоя над плоской мембраной; K_1 и K_2 — «кажущаяся» и «истинная» константы Михаэлиса соответственно; D — константа диффузии; V — максимальная скорость транспорта.

Тогда для кривой 2 (рис. 5), соответствующей плоской поверхности, величина d оказывается равной 0,005 см, т. е. такой же, какая была задана в модели. В то же время для кривой 1, соответствующей складчатой поверхности, при том же заданном значении d , толщина неперемешиваемого слоя, определенная по выражению (1), оказывается равной 0,0185 см, то есть в 3,7 раза большей. И это при том условии, что в качестве V была взята из графика «кажущаяся» величина максимальной скорости транспорта, равная $1,9 \cdot 10^{-7}$ ммоль/см²·с вместо «истинной» величины V , принятой в рассматриваемых вариантах модели, равной $3,0 \cdot 10^{-7}$ ммоль/см²·с. (Константа V выражалась в модели в расчете на единицу площади плоской поверхности, проходящей под складками.) Если же расчет толщины неперемешиваемого слоя делать по «истинному» значению V , то определенная по выражению (1) величина d оказывается равной 0,1 см, т. е. в 20 раз больше заданного значения.

Таким образом, становится очевидным, что применение в отношении поверхностей сложной формы (каковой, в частности, является поверхность слизистой тонкой кишки млекопитающих) выражений, общепринятых в отношении плоских мембран, может приводить к весьма значительным погрешностям в оценке истинной толщины неперемешиваемого водного слоя. Возможно, что именно неучет особенностей геометрии поверхности тонкой кишки является одной из причин получения весьма высоких и трудно объяснимых с различных точек зрения значений толщины диффузионных слоев над кишечными ворсинками.

Вместе с тем нельзя исключать и роль некоторых клеточных и внеклеточных структур, в частности гликокаликса, как диффузионного сопротивления в отношении различных веществ [4, 6]. Аналогичная точка зрения была недавно высказана и другими исследователями [14].

Мы видим, таким образом, что концепция премембранных жидких слоев, которая уже сегодня играет важную роль в гастроэнтерологии для правильной интерпретации свойств биологических поверхностей, по-видимому, в будущем будет играть еще большую роль в биологии и ее отдельных областях. При этом, по всей вероятности, должны учитываться как статические, так и динамические свойства премембранных слоев и особенности микро- и макрогеометрии биологических поверхностей.

Рассмотрение не только диффузионных свойств премембранных слоев, но и трансмембранных потоков жидкости позволяет наряду с закономерностями субстратного регулирования ферментативно-транспортных функций эпителия учесть особенности ряда несубстратных влияний, например осмотических градиентов, на мембранные процессы.

Уже приведенные нами предварительные результаты по анализу влияния геометрических особенностей поверхности тонкой кишки и по характеристике динамики водных потоков показывают, что учет этих факторов открывает новые возможности в объяснении целого ряда непонятных и противоречивых экспериментальных результатов.

Приложение

Стационарное распределение концентрации субстрата за счет диффузии в зоне складки может быть аппроксимировано решением эллиптического уравнения:

$$\frac{\partial^2 S}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 S}{\partial y^2} = 0 \quad (1)$$

для одной из возможных (рис. 4) в ограниченной для следующих граничных

$$S(y, x)|_{x=c} = S_0;$$

$$\left. \frac{\partial S(x, y)}{\partial n} \right|_{x=\varphi(y)} = \frac{b \cdot S(\varphi(y))}{K + S(\varphi(y))}$$

$$x = \varphi(y), \quad \left. \frac{\partial \varphi}{\partial y} \right|_{y=0} = \frac{\partial \varphi}{\partial y}$$

непрерывные функции, заданные характеристики транспорта

в соответствии с кинетикой

симальная скорость транспорта коэффициент диффузии сре

Периодичность полудующая из граничных условий конечной складчатой по

Собственные функции $S_\lambda = X(x) \cdot Y(y)$, что приводит к уравнениям:

$$\frac{\partial^2 X(x)}{\partial x^2} = -\lambda^2 X(x)$$

с решениями: $X(x) = C_1 \cos C_2 x, C_3, C_4$ — произвольные

Используя граничные

$$S_{\lambda_i} =$$

$$\text{где } \lambda_i = \frac{\pi}{h} i \quad (i = 0, 1, 2)$$

Общее решение задач

функций: $S(x, y) = \sum_{i=0}^{\infty} \cos$

вольными постоянными C_1

го условия (2) при $x =$

где $C'_{20} = \text{sh} \lambda_0 c C_{20}$. Тогда

$$S(x, y) = S_0 + C'_{20} \left(\right.$$

Постоянные C'_{20} и C_{2i} (решения $S(x, y)$), найдены субстрата на границе с

$$S'_\varphi (K + S$$

где

$$S_\varphi = S(\varphi(y), y) = S_0 +$$

$$S'_\varphi = \left. \frac{\partial S(x, y)}{\partial n} \right|_{y=\varphi} =$$

для одной из возможных форм идеализации ворсинчатой поверхности (рис. 4) в ограниченной области $Q: x \in [0, c], y \in [0, h]$. Решение ищется для следующих граничных условий в Q :

$$S(y, x)|_{x=c} = S_0; \quad \frac{\partial S(y, x)}{\partial y} \Big|_{y=0} = 0; \quad \frac{\partial S(y, x)}{\partial y} \Big|_{y=h} = 0; \quad (2)$$

$\frac{\partial S(x, y)}{\partial n} \Big|_{x=\varphi(y)} = \frac{b \cdot S[\varphi(y), y]}{K + S[\varphi(y), y]}$, где n — нормаль к границе складки;
 $x = \varphi(y)$, $\frac{\partial \varphi}{\partial y} \Big|_{y=0} = \frac{\partial \varphi}{\partial y} \Big|_{y=h} = 0$, $\varphi(y) = \varphi(-y)$, $b(y) \cdot K(y)$ — некоторые непрерывные функции, заданные на поверхности ворсинки и описывающие характеристики транспорта субстрата в каждой точке поверхности складки в соответствии с кинетикой Михаэлиса—Ментен; $b(y) = \frac{V(y)}{D}$, $V(y)$ — максимальная скорость транспорта в данной точке поверхности складки; D — коэффициент диффузии среды.

Периодичность полученного решения $S(x, y)$ уравнения (1), следующая из граничных условий (2), позволяет использовать его для бесконечной складчатой поверхности при $y \in [-\infty, \infty]$, $x \in [0, c]$.

Собственные функции уравнения (1) представляются в виде $S_\lambda = X(x) \cdot Y(y)$, что приводит к системе обыкновенных дифференциальных уравнений:

$$\frac{\partial^2 X(x)}{\partial x^2} - \lambda^2 X(x) = 0; \quad \frac{\partial^2 Y(y)}{\partial y^2} + \lambda^2 Y(y) = 0$$

с решениями: $X(x) = C_1 \operatorname{ch} \lambda x + C_2 \operatorname{sh} \lambda x$; $Y(y) = C_3 \cos \lambda y + C_4 \sin \lambda y$, где C_1, C_2, C_3, C_4 — произвольные постоянные.

Используя граничные условия (2) при $y = 0, h$, имеем:

$$S_{\lambda_i} = \cos \lambda_i y (C_{1i} \operatorname{ch} \lambda_i x + C_{2i} \operatorname{sh} \lambda_i x), \quad (3)$$

где $\lambda_i = \frac{\pi}{h} i$ ($i = 0, 1, 2, \dots$).

Общее решение задачи $S(x, y)$ находится суперпозицией собственных функций: $S(x, y) = \sum_{i=0}^{\infty} \cos \lambda_i y (C_{1i} \operatorname{ch} \lambda_i x + C_{2i} \operatorname{sh} \lambda_i x)$, а связь между произвольными постоянными C_{1i}, C_{2i} ($i = 0, 1, 2, \dots$) устанавливается из граничного условия (2) при $x = c$: $C_{1i} = C_{2i} \operatorname{th} \lambda_i c$ ($i = 1, 2, 3, \dots$); $C_{10} = S_0 - C'_{20}$, где $C'_{20} = \operatorname{sh} \lambda_0 c C_{20}$. Тогда

$$S(x, y) = S_0 + C'_{20} \left(\frac{x}{c} - 1 \right) + \sum_{i=1}^{\infty} C_{2i} \cos \lambda_i y (\operatorname{sh} \lambda_i x - \operatorname{th} \lambda_i c \cdot \operatorname{ch} \lambda_i x).$$

Постоянные C'_{20} и C_{2i} ($i = 1, 2, 3, \dots$) и вместе с ними окончательный вид решения $S(x, y)$, находятся из граничного условия (2) для транспорта субстрата на границе складки:

$$S'_\varphi (K + S_\varphi) - b S_\varphi = 0 \text{ для любого } y \in [0, h], \quad (4)$$

где

$$S_\varphi = S(\varphi(y), y) = S_0 + C'_{20} \left(\frac{\varphi}{c} - 1 \right) + \sum_{i=1}^{\infty} C_{2i} \cos \lambda_i y (\operatorname{Sh} \lambda_i \varphi - \operatorname{th} \lambda_i c \operatorname{Ch} \lambda_i \varphi);$$

$$S'_\varphi = \frac{\partial S(x, y)}{\partial n} \Big|_{y=\varphi} = (V \sqrt{1 + (\varphi')^2})^{-1} \left\{ \frac{C'_{20}}{c} + \sum_{i=1}^{\infty} \lambda_i C_{2i} [\cos \lambda_i y (\operatorname{Ch} \lambda_i \varphi - \right.$$

$$-th\lambda_i c \cdot \text{Sh } \lambda_i \varphi + \varphi' \sin \lambda_i y (\text{Sh } \lambda_i \varphi - th\lambda_i c \text{Ch } \lambda_i \varphi) \Big\}, \quad \varphi' = \frac{d\varphi}{dy}.$$

Для отыскания C_{20}' , C_{2i} ($i=1, 2, 3, \dots$) используется численный метод, основанный на поиске минимума функционала J :

$$J = \int_0^h [S_\varphi'(K + S_\varphi) - bS_\varphi]^2 dy = \min_{C_{20}', C_{2i}} \quad (5)$$

на одномерной сетке в области $y \in [0, h]$.

При реализации этого метода на ЭВМ условием отбрасывания лишних корней нелинейного уравнения (4) для C_{20}' , C_{2i} ($i=1, 2, \dots$) служит требование неотрицательности концентрации субстрата $S(x, y)$ у основания складки. Для формы складки, представленной на рис. 4, это условие имеет вид:

$$S(0, h) = S_0 - C_{20}' + \sum_{i=1}^{\infty} C_{2i} th\lambda_i c \geq 0. \quad (6)$$

Численное решение уравнения (4) осуществлялось для функции $\varphi(y) = A \left(1 + \cos \frac{\pi}{h} y \right)$; $b = \text{const}$; $K = \text{const}$.

Поиск минимума функционала (5) осуществлялся на сетке, содержащей 51 узел. Вычислялись первые три постоянные C_{20}' , C_{21} , C_{22} , так как влияние других постоянных на общее решение оказалось незначительным.

V. M. Gusev, A. A. Gruzdkov, A. M. Ugolev

UNSTIRRED PREMEMBRANE LAYERS

Summary

The modern concepts of the unstirred water layer effect on membrane hydrolysis and nutrient transport (as a model of exchange between the extracellular and intracellular media) are critically considered through the example of the small intestine epithelium. Mathematical models are developed which, along with diffusion properties of pre-membrane layers, take into account transepithelial water flows and peculiarities of geometry of the intestine surface. The direction and amount of transepithelial water flows are shown to have a significant influence on the barrier and nutritive functions of the intestine epithelium as well as on experimentally determined values of kinetic constants K_t and V . According to the simulation data an approximation of the intricate intestinal surface by a flat membrane does not seem to be correct and may lead to a considerable overestimation of the real thickness of unstirred water layer.

I. P. Pavlov Institute of Physiology, Leningrad

Список литературы

1. Бреслер В. М., Никифоров А. А. Транспорт органических кислот через плазматические мембраны дифференцированных эпителиальных слоев у позвоночных.—Л.: Наука, 1981.—203 с.
2. (Груздков А. А., Гусев В. М., Уголев А. М.) Gruzdkov A. A., Gusev V. M., Ugolev A. M. The three-compartmental enzyme system of the enterocyte relating to its digestive and barrier functions.—In: Advances in physiological sciences, Budapest: Akad. Kiadó, 1981, vol. 29. Gastrointestinal defence mechanisms, p. 303—314.
3. Гусев В. М., Груздков А. А., Уголев А. М. Трехкомпонентная энзимная система энтероцита, относящаяся к его пищеварительным и защитным функциям.—Изв. АН СССР. Сер. биол., 1981, № 5, с. 721—731.
4. Комиссарчик Я. Ю., Уголев А. М. Ультраструктура и возможное функциональное значение гликокаликса микроворсинок кишечных клеток.—Докл. АН СССР, 1970, 194, № 3, с. 731—733.
5. Никольский Н. Н. Всасывание сахаров.—В кн.: Руководство по физиологии. Физиология всасывания. Л.: Наука, 1977, с. 249—284.

6. Уголев А. М. Мембранное регулирование.—Л.: Наука, 1979.—262 с.
7. Шноль С. Э. Физико-химия.—1979.—262 с.
8. Diamond J. M. A rapid across membranes.—J. Phys.
9. Gardner M. L. G., Atkins (Sci., 1980, 25, N 6, p. 474—479).
10. Hajjar J. J., Schedl H. P. intestine in vivo.—Biochim.
11. Levin R. J. Fundamental cation.—In: Scientific basis stone, 1979, p. 308—337.
12. Parsons D. S. Unstirred layer.—Ch. 21, p. 407—430.
13. Ryu Kyoo Hai, Grim E. U. 1982, 242, N 4, p. 364—369.
14. Smithson K. W., Miller D. unstirred water layer or membrane.—p. 1241—1244.
15. Thomson A. B. R. Limitations of intestinal transport.—Biol., 1979, 47, N 1, p. 39.
16. Thomson A. B. R., Dietsch effects of unstirred water layer in the intestine.—J. Phys.
17. Thomson A. B. R., Dietsch unstirred water layer on transport in rabbit jejunum.—J. Phys.
18. Thomson A. B. R., Weinstein intestinal mucosa. Rate of biopsies.—Digestive Dis. and Nutrition.
19. Winne D. Unstirred layer, port.—Biochim. et biophys.
20. Winne D. Correction of transport layer, if a passive transport.—464, N 1, p. 118—126.
21. Winne D., Kopf S., Ulmer phenylalanine in vivo.—Biophys. J.
22. Wilson F. A., Dietsch J. A. on active transport kinetic

Институт физиологии им. И. П. Павлова
Ленинград

6. Уголев А. М. Мембранное пищеварение. Полисубстратные процессы, организация и регуляция.— Л.: Наука, 1972.— 358 с.
7. Шноль С. Э. Физико-химические факторы биологической эволюции.— М.: Наука, 1979.— 262 с.
8. Diamond J. M. A rapid method for determining voltage—concentration relations across membranes.— J. Physiol., 1966, **183**, N 1, p. 83—100.
9. Gardner M. L. G., Atkins G. L. Kinetics of intestinal transport.— Digestive Dis. and Sci., 1980, **25**, N 6, p. 474—476.
10. Hajjar J. J., Schedl H. P. Amino acid influx across the mucosal border of the rat intestine *in vivo*.— Biochim. et biophys. acta, 1981, **649**, N 3, p. 759—568.
11. Levin R. J. Fundamental concepts of structure and function of the intestinal epithelium.— In: Scientific basis of gastroenterology. Edinburgh etc.: Churchill Livingstone, 1979, p. 308—337.
12. Parsons D. S. Unstirred layer.— In: Intestinal ion transport. London: MTP Press, 1976, Ch. 21, p. 407—430.
13. Ryu Kyoo Hai, Grim E. Unstirred water layer in canine jejunum.— Amer. J. Physiol., 1982, **242**, N 4, p. 364—369.
14. Smithson K. W., Miller D. B., Jacobs L. R., Gray G. M. Intestinal diffusion barriers unstirred water layer or membrane surface mucous coat?— Science, 1981, **214**, N 4526, p. 1241—1244.
15. Thomson A. B. R. Limitations of the Eadie-Hofstee plot to estimate kinetic parameters of intestinal transport in the presence of an unstirred water layer.— J. Membrane Biol., 1979, **47**, N 1, p. 39—57.
16. Thomson A. B. R., Dietschy J. M. Derivation of the equations that describe the effects of unstirred water layers on the kinetic parameters of active transport processes in the intestine.— J. Theor. Biol., 1977, **64**, N 2, p. 277—292.
17. Thomson A. B. R., Dietschy J. M. Experimental demonstration of the effect of the unstirred water layer on the kinetic constants of the membrane transport of D-glucose in rabbit jejunum.— J. Membrane Biol., 1980, **54**, N 1, p. 221—229.
18. Thomson A. B. R., Weinstein W. M. Transport kinetics of D-glucose in human small intestinal mucosa. Rate constants in histologically normal and abnormal mucosal biopsies.— Digestive Dis. and Sci., 1979, **24**, N 6, p. 442—448.
19. Winne D. Unstirred layer, source of biased Michaelis constant in membrane transport.— Biochim. et biophys. acta, 1973, **298**, N 1, p. 27—31.
20. Winne D. Correction of the apparent Michaelis constant, biased by an unstirred layer, if a passive transport component is present.— Biochim. et biophys. acta, 1977, **464**, N 1, p. 118—126.
21. Winne D., Kopf S., Ulmer M.-L. Role of unstirred layer in intestinal absorption of phenylalanine *in vivo*.— Biochim. et biophys. acta, 1979, **550**, N 1, p. 120—130.
22. Wilson F. A., Dietschy J. M. The intestinal unstirred layer: its surface area and effect on active transport kinetic.— Biochim. et biophys. acta, 1974, **363**, N 1, p. 112—126.

Институт физиологии им. И. П. Павлова,
Ленинград

Поступила 09.03.83