

25. Grossman M. I. Neural and hormonal stimulation of gastric secretion of acid // *Handbook of physiology*. — Washington, 1967, vol. 11. — P. 835—864.
26. Grube D., Forssmann W. G. Morphology and function of the enteroendocrine cells // *Hormone and Metab. Res.* — 1979. — 11, N 9. — P. 589—606.
27. Raptis S., Dollinger H. C., Berger L. von, et al. Effects of somatostatin on gastric secretion and gastrin release in man. — *Digestion*. — 1975. — 13, N 1/2. — P. 15—26.
28. Stadil F., Rehfeld F. Release of gastrin by epinephrine // *Gastroenterology*. — 1973. — 65, N 2. — P. 210—215.
29. Stanley M. D., Coalson R. E., Grossman M. I., Johnson L. R. Influence of secretin and pentagastrin on acid secretion and parietal cell number in rats // *Ibid.* — 1972. — 63, N 2. — P. 264—269.

Ин-т физиологии им. А. А. Богомольца
АН УССР, Киев

Поступила 23.12.85

УДК 612.33+612.386

В. В. Сурмак, Е. А. Багирова, Э. Г. Гурман

РОЛЬ КАЛЬЦИЯ В ТРАНСПОРТЕ МОНОСАХАРИДОВ В ТОНКОЙ КИШКЕ КРЫС

Мы определили [1, 15] зависимость транспорта глюкозы в тонкой кишке крыс от присутствия ионов Са. Выявлены некоторые факторы, влияющие на Ca^{2+} -зависимость интестинального транспорта глюкозы. Так, в условиях аноксии Ca^{2+} -зависимость транспортных систем для глюкозы исчезает [2, 5]. Чувствительность транспортных систем энтероцитов к Ca^{2+} убывает в проксимо-дистальном направлении [6]. Транспорт глюкозы, образующейся при мембранном гидролизе дисахаридов в отличие от транспорта свободной глюкозы не проявляет чувствительности к Ca^{2+} [6], хотя у собственно мембранных карбогидраз чувствительность к Ca^{2+} обнаружена [8] и определена локализация центра связывания Ca^{2+} [6].

Анализ данных о Ca^{2+} -связывающих белках тонкой кишки позволил высказать предположение о физиологическом значении Ca^{2+} в регуляции транспорта углеводов [6]. Оставалось, однако, неясным: является ли Ca^{2+} -зависимость особенностью только транспортных систем для глюкозы? Сохраняется ли Ca^{2+} -зависимость углеводного транспорта, первоначально обнаруженная на экстирпированных кусочках тонкой кишки *in vitro*, в препаратах с ненарушенным кровотоком *in vivo*? Поэтому мы продолжили исследования условий, влияющих на проявление Ca^{2+} -чувствительности углеводного транспорта.

Методика

В экспериментах использовали крыс породы Вистар, самцов массой 180—200 г. голодавших 18—24 ч.

Опыты *in vitro* выполнены с помощью техники канюлированного вывернутого мешка (КВМ) [2]. КВМ готовили на холоду из участков (4 см) экстирпированной тонкой кишки (без двенадцатиперстной) декапитированных животных. Сгруппированные (по три) КВМ инкубировали в термостатируемых при 37 °C растворах (10 ммоль/л) объемом 100 мл субстратов — D-глюкоза, D-галактоза, D-фруктоза, приготовленных на растворе Рингера (pH 7,4) или на аналогичном солевом растворе без Ca^{2+} . Кроме того, в части опытов в инкубационный раствор вносили ЭДТА (2 ммоль/л), при этом pH раствора восстанавливали до значения 7,4 сухим NaOH. Транспорт оценивали по накоплению гексоз в ткани и в серозном растворе, заполнявшем КВМ.

Опыты *in vivo* выполнены с помощью техники перфузии изолированного и функционирующего участков кишки. Оперативную подготовку животных с изолированным участком осуществляли по Уголеву и Зарипову [10]. Крыс под нембуталовым наркозом вскрывали по белой линии, выделяли участок тонкой кишки длиной 10 см, дистальнее

двенадцатиперстной кишки на 10 см. Концы изолированного участка выводили с помощью фистул, снабженных сетчатым каркасом, в отверстия боковой стенки живота. Пропроходимость кишечника восстанавливали по способу «конец в конец». Пересекаемые сосуды тщательно лигировали и ушивали рану с соблюдением правил асептики и антисептики. Оперированные таким образом животные поступали в опыт через 10–12 сут.

Для перфузии функционирующего участка кишки осуществляли операцию, отличающуюся от вышеописанной тем, что выделенный участок с помощью У-образных сосудов включали в нормальный пассаж химуса подшиванием проксимальных культей по способу «конец в бок». При этом часть выделенного участка (1–2 см) от пересечения от соустья служила «живой» фистулой, обеспечивающей доступ в полость кишки во время перфузии и предотвращающей вытекание химуса вне опыта.

Перфузию осуществляли с помощью перистальтического насоса со скоростью 0,5 мл/мин по термостатируемой системе трубок. Сбор проб (3–5-минутные интервалы) осуществляли коллектором фракций перфузата при 0 °С. Перфузионные растворы готовили на растворе Рингера (рН 7,4). Исходная концентрация субстратов (D-глюкоза и D-фруктоза) составляла 25 ммоль/л. В части опытов в перфузионные растворы добавляли ЭДТА из расчета 2,5; 20 и 50 ммоль/л. Всасывание глюкозы и фруктозы в опытах *in vivo* оценивали по убыли субстратов в оттекающем перфузате по сравнению с введенным. Кроме того, в этих опытах регистрировали разбавление перфузата физиологическими жидкостями или его концентрирование за счет всасывания воды с помощью инертной невсасывающейся метки — полиэтиленгликоля («Полиокс-100»), концентрацию которого определяли турбидиметрически [12]. Концентрацию гексоз определяли мышьяково-молибденовым методом [9]. В расчеты вносили поправки на баланс воды и кратковременные колебания скорости перфузии. Данные обработаны статистически.

Результаты

В табл. 1 представлены данные об активности *in vitro* транспортных систем для трех стереоизомерных гексоз при наличии и отсутствии Ca^{2+} . Соотношение контрольных значений показателя транспорта гексоз при наличии Ca^{2+} хорошо согласуется с общепринятым [7]. Из данных видно, что при отсутствии Ca^{2+} существенно угнетается тран-

Таблица 1. Транспорт гексоз *in vitro* при инкубации (60 мин) канюлированных вывернутых мешков из тонкой кишки крыс в 10 ммоль/л растворах субстратов ($M \pm m$), ммоль/л

Показатель	Инкубация		
	с Ca^{2+}	без Ca^{2+}	с ЭДТА*
Раствор глюкозы			
Аккумуляция в ткани	24,44 ± 1,11 (27)**	12,43 ± 0,87 (5)	10,39 ± 0,66 (5)
Транспорт в серозный раствор	18,86 ± 0,89 (27)	9,07 ± 0,91 (5)	8,99 ± 0,68 (5)
Раствор галактозы			
Аккумуляция в ткани	17,24 ± 1,33 (9)	11,55 ± 1,01 (7)	8,15 ± 0,91 (4)
Транспорт в серозный раствор	12,78 ± 1,40 (5)	8,70 ± 0,77 (5)	Нет свед.
Раствор фруктозы			
Аккумуляция в ткани	6,62 ± 0,50 (12)	8,39 ± 0,71 (7)	6,95 ± 0,37 (10)
Транспорт в серозный раствор	3,49 ± 0,29 (7)	3,80 ± 0,42 (7)	4,52 ± 0,47 (5)

* Концентрация ЭДТА составляет 2 ммоль/л. ** В скобках указано число опытов.

спорт глюкозы и галактозы, тогда как транспорт фруктозы не меняется. Аналогичный эффект наблюдается при удалении связанного Ca^{2+} с помощью ЭДТА.

В табл. 2 сведены данные о влиянии различных концентраций ЭДТА на транспорт глюкозы и фруктозы *in vivo*. Использование бес-

Т а б л и ц а 2. Влияние различных концентраций ЭДТА в растворах гексоз, перфузируемых* через изолированный или функционирующий участок, на всасывание глюкозы и фруктозы *in vivo*, ммоль/л

Концентрация ЭДТА в растворе	Изолированный участок		Функционирующий участок	
	Глюкоза	Фруктоза	Глюкоза	Фруктоза
Контроль I	8,82±0,44	0,61±0,14	22,35±1,09	9,85±0,85
2 ммоль/л	6,02±0,51	0,62±0,10	—	—
Контроль II	8,74±0,37	0,74±0,19	—	—
5 ммоль/л	3,15±0,56	0,74±0,18	—	—
Контроль III	6,90±0,70	0,66±0,29	—	—
10 ммоль/л	—	—	22,17±1,14	9,53±0,68
20 ммоль/л	—	—	16,47±0,93	—
Контроль IV	—	—	21,84±0,95	—
50 ммоль/л	0,29±0,30	0,39±0,21	11,11±1,49	8,64±0,99
Контроль V	0,10±0,11	0,50±0,28	15,86±5,39	8,00±0,77
Контроль VI	—	—	—	—
(через 3 сут)	0,38±0,15	—	18,10±2,49	—

* Скорость перфузии составляла 0,5 мл/мин. Число опытов составляло 5.

кальциевых растворов в случае сохраненного кровотока не информативно, так как гомеостатирование содержания Ca^{2+} в перфузируемом участке эффективно нивелирует отсутствие в растворе 2 ммоль/л Ca^{2+} . Из представленных данных видно, что в функционирующем участке ЭДТА (концентрация 50 ммоль/л), эффективно декальцинирующая перфузируемый регион, подавляет транспорт глюкозы, но не фруктозы. При 50 ммоль/л ЭДТА угнетение транспорта глюкозы отчетливо выражено как в функционирующем, так и в изолированном участке кишки. При меньших концентрациях ЭДТА реакция транспортных систем функционирующего и изолированного участков различна. Так, 5 ммоль/л глубоко угнетает транспорт глюкозы в изолированном участке, тогда как даже 10 ммоль/л ЭДТА не влияет на транспорт глюкозы в функционирующем участке кишки. Обратимое угнетение транспорта глюкозы в случае изолированного участка наблюдается при концентрации ЭДТА 2 ммоль/л, а в случае функционирующего — при 20 ммоль/л.

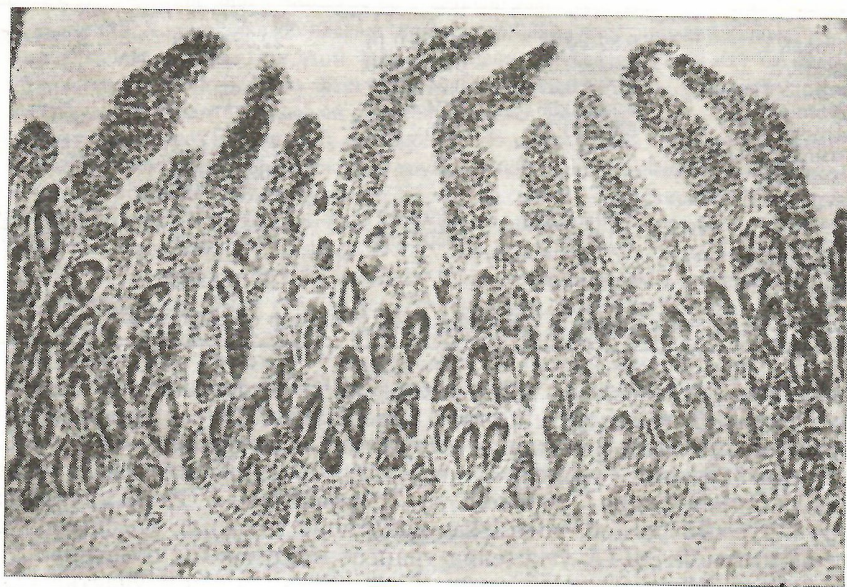
Отдаленные последствия воздействия 50 ммоль/л ЭДТА на слизистую изолированного и функционирующего участков существенно различаются: в функционирующем участке контрольное значение показателя всасывания практически восстанавливается в ходе опыта при замене раствора, содержащего ЭДТА, контрольным раствором, тогда как в изолированном — значение показателя транспорта после обработки кишки ЭДТА остается низким на протяжении нескольких суток. Следует отметить некоторые явления, сопутствующие перфузии участков высокими концентрациями ЭДТА. Во время перфузии функционирующего участка кишки крысы вели себя без признаков дискомфорта. В случае изолированного участка животные часто проявляли беспокойство, оттекающий перфузат становился мутным, в нем резко возрастало число десквамированных энтероцитов, сопровождавшее бурную дезэпителизацию кишки. Последнее подтверждено микроскопически и гистологически — в некоторых случаях декальцинация приводила к полной дезэпителизации кишки (рисунок).

Обсуждение

Результаты опытов *in vitro* показали, что по чувствительности к присутствию Ca^{2+} транспортные системы для гексоз резко отличаются. Транспорт галактозы и глюкозы — Ca^{2+} -чувствительный процесс, а транспорт фруктозы не зависит от Ca^{2+} . В последнее время показано, что транспорт глюкозы и галактозы в естественных условиях обслуживается различными механизмами [14]. При редукции эксперименталь-

ной модели до уровня препаратов, применяемых в опытах *in vitro*, по большинству параметров эти системы становятся неотличимы [7, 11]. Вероятно, чувствительность к Ca^{2+} также относится к разряду таких параметров.

Транспорт фруктозы, обслуживаемый отличным от глюкозного механизмом [4, 7, 11], оказался Ca^{2+} -независимым процессом. Это сле-



Морфологическая структура слизистой оболочки изолированного участка тонкой кишки после перфузии 50 ммоль/л ЭДТА, сопровождавшейся интенсивной деэпителизацией. $\times 80$.

дует сопоставить со сведениями о том, что транспорт фруктозы осуществляется в основном пассивным образом по принципу облегченной диффузии [4, 7]. Мы показали [5], что в условиях, когда транспорт глюкозы осуществляется пассивно, этот процесс становится Ca^{2+} -независимым. Возможно, такое совпадение отражает предполагаемое [6] участие Ca^{2+} в энергетизации активного транспорта.

Исследование роли Ca^{2+} в транспорте углеводов на целостном организме затруднено высокоэффективным гомеостазированием уровня Ca^{2+} в периделлюлярной и внутриклеточной средах [14]. Тем не менее применение ЭДТА — активно хелатирующего агента — выявило *in vivo* влияние Ca^{2+} на транспорт глюкозы, но не фруктозы. Представляется важным тот факт, что изолированный участок кишки оказался более уязвимым для декальцинирующих воздействий, чем функционирующий. Действительно, по ряду признаков изолированный участок несет черты глубокой атрофии — масса его снижается более чем на 30 % по сравнению с функционирующим, активность транспортных систем как для глюкозы, так и для фруктозы в изолированном участке существенно ниже, чем в функционирующем.

Вероятно, механизм действия ЭДТА на кишечную стенку складывается из двух эффектов, зависящих от концентрации ЭДТА и состояния слизистой. Первый заключается в воздействии на локальное содержание Ca^{2+} . Захватывая Ca^{2+} возле транспортных систем и восполняющий его поток Ca^{2+} из крови, ЭДТА вызывает обратимое угнетение транспорта глюкозы. Второй эффект присоединяется к первому при более высокой концентрации ЭДТА или при ослабленном, например, вследствие атрофии состоянии слизистой. Он в основном заключается в деструкции мукозы — разрушаются межклеточные контакты, обычно фиксируемые Ca^{2+} -мостиками [13], энтероциты усиленно дескваминируются и лишенная основных рабочих элементов слизистая на-

долго теряет способность к транспорту углеводов. Последнее, вероятно, имеет значение для исследования ряда клинически значимых патологий желудочно-кишечного тракта, например кишечной формы острой лучевой болезни.

Таким образом, кальций участвует в функционировании углеводных транспортных систем, если транспорт осуществляется активно. Этот эффект может быть воспроизведен на целостном организме *in vivo*.

V. V. Surmak, E. A. Bagirova, E. G. Gurman

THE ROLE OF CALCIUM IN THE MONOSACCHARIDE TRANSPORT IN THE RAT SMALL INTESTINE

Intestinal fructose transport does not decrease without Ca^{2+} while galactose and glucose transport gets considerably lower. The Ca^{2+} -dependence of glucose (but not fructose) transport may be obtained *in vivo* with EDTA treatment. The functional statement of intestinal mucosa greatly influences the Ca^{2+} -effects.

I. I. Mechnikov University, Odessa

1. Багирова Е. А., Сурмак В. В., Гурман Э. Г. Влияние кальциевых ионофоров на систему транспорта сахаров в тонкой кишке // Тез. докл. II Всесоюз. конф. по химии макроциклов. — Одесса, 1984. — С. 191.
2. Багирова Е. А., Сурмак В. В., Гурман Э. Г. Регуляция функционирования транспортирующих глюкозу систем тонкой кишки двухвалентными катионами в опытах *in vitro* // Физиол. журн. — 1985. — 31, № 6. — С. 662—667.
3. Богатский А. В., Гурман Э. Г., Головенко Н. Я., Метешкин Ю. В. Канюлированный вывернутый мешок из тонкой кишки — модель для изучения всасывания ксенобиотиков // Докл. АН УССР. — 1978. — № 8. — С. 683—690.
4. Баркони Т., Виттман Т., Варро В. Перенос фруктозы в изолированной тонкой кишке собаки // Физиол. журн. СССР. — 1982. — 68, № 9. — С. 1269—1273.
5. Гурман Э. Г. Регуляция активности глюкозных транспортных систем в тонкой кишке, опосредованная ионами кальция // Физиол. журн. — 1985. — 31, № 6. — С. 657—662.
6. Гурман Э. Г., Сурмак В. В., Багирова Е. А. Роль ионов кальция в функционировании углеводных ферментативно-транспортных ансамблей энтероцитов // Мембранный гидролиз и транспорт: Новые факты и гипотезы / Под ред. А. М. Уголева. — М.: Наука, 1985. — 230 с.
7. Никольский Н. Н. Всасывание сахаров // Физиология всасывания. — Л.: Наука, 1977. — С.
8. Пономаренко Е. Д. Глицириновые модели энтероцитов и их использование для изучения мембранного пищеварения: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Львов, 1984. — 24 с.
9. Уголев А. М., Иезуитова Н. Н., Масевич Ц. Г. и др. Исследование пищеварительного аппарата у человека. — Л.: Наука, 1969. — 216 с.
10. Уголев А. М., Заринов Б. З. Исследование мембранного гидролиза и транспорта в хронических экспериментах на мелких лабораторных животных // Физиол. журн. СССР. — 1979. — 65, № 12. — С. 1211—1217.
11. Уголев А. М., Заринов Б. З., Иезуитова Н. Н. и др. Особенности мембранного гидролиза и транспорта в тонкой кишке в условиях, близких к физиологическим (ре-визия существующих данных и представлений) // Биол. мембраны. — 1984. — 1, № 10. — С. 997—1019.
12. Malewar S. J., Pawell D. W. An improved turbidimetric analysis of polyethylene glycol utilizing an emulsifier // Gastroenterology. — 1967. — 53, N 2. — P. 250—256.
13. Pitelka D. K., Jaggart B. N., Hamamoto S. J. Effect of extracellular calcium depletion on membrane topography and occluding functions of mammary epithelial cells in culture // J. Cell. Biol. — 1983. — 96, N 3. — P. 613—624.
14. Rasmussen H., Waisman D. M. Modulation of cell function in the calcium messenger system // Rev. Physiol., Biochem. and Pharmacol. — 1983. — 95. — P. 111—148.

Одес. ун-т им. И. И. Мечникова
МВССО УССР

Поступила 06.12.85