

63. Putkey I. A., Weeksler W. R., Norman A. W. The interaction of 1.25 dihydroxyvitamin D₃ with its intestinal mucosa receptor: kinetic parameters and structural requirements // *Lipids*.—1978.—13, N 10.—P. 723—729.
64. Rasmussen H., Fontaine O., Matsumo T. Liponoaric regulation of calcium transport by 1.25 (OH)₂D₃ // *Ann. N. Y. Acad. Sci.*—1981.—372.—P. 518—528.
65. Rutherford W. E., Hruska K. The effect of 5,6-transvitamin D₃ on calcium absorption in chronic renal disease // *J. Clin. Endocrinol. and Metabol.*—1975.—40, N 1.—P. 13—18.
66. Seim K. E., Salter E. L. Untersuchungen mit Calcium—47 zur Calcium Resorption aus einem Calcium-Vitamin D—Kombinationspräparat // *Mediz. Clin.*—1976.—N 36.—S. 1439—1444.
67. Smith E. M., DeLuca H. F., Tanaka Y. Stimulation of lead absorption by vitamin D administration // *J. Nutr.*—1978.—108, N 5.—P. 843—847.
68. Song M. R., Adham N. F. Role of prostaglandin E₂ in zinc absorption in the rat // *Amer. J. Physiol.*—1978.—234, N 2.—P. E99—E105.
69. Spencer R., Charman M., Wilson P. W. et al. The relationship between vitamin D-stimulated calcium transport and intestinal calcium-binding protein // *Biochem. J.*—1978.—170, N 1.—P. 92—101.
70. Thomasset M., Guisnier-Gleizes F., Mathien R. et al. Intestinal calcium binding protein and bone calcium mobilization in response to 25R, 26 and 26 dehydroxycholecalciferol in intact and nephrectomized rats // *Eur. J. Clin. Investig.*—1978.—8, N 4.—P. 225—232.
71. Thomasset M., Guisnier-Gleizes F., Mathien R. et al. Effect of vitamin D or calcium deficiency on duodenal, jejunal and ileal calcium binding protein and on plasma calcium and 25-hydroxycholecalciferol levels in the growing pig // *Ann. Biol. Anim.*—1979.—19, N 133.—P. 764—778.
72. Ueng T. H., Bronner P. Cellular and luminal forms of rat intestinal-binding protein as studied by counter ion electrophoresis // *Arch. Biochem. and Biophys.*—1979.—197, N 1.—P. 205—217.
73. Waling M. W., Rothmann S. S. Adaptive uptake of calcium at the duodenal brush border // *Amer. J. Physiol.*—1973.—225.—P. 618—624.
74. Wapnir R. Absorption of zinc by the rat ileum: effects of histidine and other low-molecular weight ligands // *J. Nutr.*—1983.—113, N 7.—P. 1346—1354.
75. Wilson T. H. Intestinal absorption.—Philadelphia; London, 1962.—200 p.
76. Wilz D. R., Gray R. W., Dominguez J. H., Lemann J. Plasma 1.25(OH)₂-vitamin D concentrations and net intestinal calcium, phosphate and magnesium absorption in humans // *Amer. J. Clin. Med.*—1979.—12, N 10.—2052—2060.
77. Zembeck F., Sewing K. Tr., Winne D. Der Einfluss von 5-Hydroxytryptamin auf die Resorption von Tritium-Wasser (HTO) aus dem Dunndarm der Ratte // *Arch. Exp. Pathol. and Pharmakol.*—1964.—247.—S. 100—110.

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

Поступила 01.04.85

УДК 612.4:578.086.3

В. К. Ковальчук, А. И. Корсуновский

ГЛИКОКАЛИКСНЫЕ ПУЗЫРЬКИ ЭНТЕРОЦИТОВ — РЕЗЕРВ МЕМБРАННОГО ГИДРОЛИЗА ?

Изучение ультраструктуры исчерченной каемки энтероцитов и колоноцитов выявило существование в ней мелких сферических образований [8, 32, 33, 36, 38, 40], которые в литературе известны под разными названиями: «кокковидные тельца» [8], «К-тельца» [38], «межмикроворсинковые частички» [35], «мембранные тельца» [28], «гликокаликсные тельца» [34], «пузырьки мембран исчерченной каемки» [16], «сферические частички» [36], «секреторные везикулы» [5, 6] и т. п. В настоящем сообщении они определены как гликокаликсные пузырьки (ГП).

Гликокаликсные пузырьки имеют круглую или (реже) овальную форму, электронно-прозрачное содержимое, они окружены мембраной, которая по строению идентична плазмолемме апикального полюса энтероцита, на поверхности мембраны расположен тонкий слой гликокаликса. Размеры ГП по диаметру не превышают 75—80 нм. ГП располагаются поодиночке или группами, цепочками вдоль контура микроворсинок, реже — у их основания. ГП обнаружены у новорожденных

и взрослых крыс [32, 33, 39], кроликов [4], новорожденных свиней [40], кошек [7], мышей [29, 30], а также у цыплят [24] и других животных.

Назначение ГП дискутабельно. Сведения о их функции довольно скудны. В обзоре Елецкого и Цибулевского [1], посвященном ультраструктурным и молекулярным основам транспорта веществ через плазмолемму энтероцитов, ГП описаны, на основании данных Dougherty [12], как продукт обновления матрикса и мембраны микроворсинок почкованием их поверхности. Связь ГП с физиологическими процессами, происходящими, например, в кишке, прослежена в ряде работ. Так, у хомяков, которых кормили после 48-часового голодания, число ГП было заметно выше, чем только у голодавших животных [28]; добавление в легко усвояемую пищу обычным и безмикробным цыплятам грубоволокнистых примесей не влияло на продукцию ГП [18]. Прослеживается определенная корреляция между выходом ГП и функциональным состоянием клеток, между продукцией ГП и дифференцировкой клеток, в частности, было подсчитано, что «микропузырьки» в верхней трети тонкой кишки белок обнаруживаются у 50 % клеток, в средней ее части — у 30 %, в нижней — у 20 % энтероцитов [12]. По другим данным [18], «мембранзависимые пузырьки» выявляются в основном в верхней части кишечного канала цыплят и преимущественно — в высокодифференцированных микроворсинчатых энтероцитах верхней трети ворсин.

Причинные связи ГП требуют дальнейшей разработки. Hobbs [18] на основании экспериментов с гнотобионтами и использованием грубоволокнистой диеты пришел к выводу, что образование ГП регулируется внутренними факторами, связанными со зрелостью клетки. Misch и соавт. [28] рассматривают четыре гипотетических фактора, которые могут влиять на продукцию ГП: по их мнению, мембраны микроворсинок способны фрагментироваться под абразивным действием жидкости и твердой фазы содержимого кишек, образуя затем гликокаликсные пузырьки; не исключено, что ГП могут быть продуктом секреции как естественной функции энтероцитов; ГП можно также рассматривать как результат денатурации отдельных компонентов мембран микроворсинок (особенно, ферментов после периода пищеварительной активности), наконец, это может быть реакцией нормально функционирующей плазмолеммы, обеспечивающей очищение поверхности эпителия от антигенов вирусного и бактериального происхождения, а также токсинов.

Наиболее сомнительным в этом перечне можно считать механический фактор. Во-первых потому, что «абразивное» действие содержимого кишки вряд ли может быть реализовано через слой слизи и гликокаликса, покрывающих плазмолемму энтероцитов; во-вторых, образование ГП идет наиболее интенсивно в верхней трети ворсин, но не на их верхушке, покрытой клетками, закончившими свой жизненный цикл и не способными к интенсивному экзоцитозу [28]; в-третьих, опыт с перфузией полуизолированного сегмента тощей кишки крыс раствором Рингера показал, что десквамативный эффект при этом незначителен [9].

Физиологический процесс образования ГП может регулироваться различными эндо- и экзогенными факторами. Везикуляция в области исчерченной каемки усиливается в условиях гипоксемии [11, 41], после обработки аминоптерином [25], гипертоническим и гипотоническим растворами хлорида натрия [26], дезоксихолатом натрия [15], четыреххлористым углеродом [3], замедляется при голодании [27, 28]. Действуя таурохолатом натрия и хендесоксихолатом натрия, дозами, несколько превышающими верхний физиологический порог (3 ммоль/л), на полуизолированный отрезок тощей кишки крыс Vossman и соавт. [9] вызывали повышенное пузырькование плазмолеммы энтероцитов. В промывной жидкости при этом увеличивалось содержание мембранзависимых энзимов, особенно энтеропептидаз и γ -1,4-глюкозидаз, а так-

же цитозольных ферментов. Лизосомальные и митохондриальные ферменты в перфузионной жидкости едва улавливались.

Гликокаликсным пузырькам приписывали дисахаридазную активность [13, 31], однако исчезновение сахарозной активности после удаления с поверхности энтероцитов кролика слоя гликокаликса ставит под сомнение этот факт [14]. Морозов и соавт. [5, 6] утверждают, что в гликокаликсе на поверхности ГП присутствует ряд ферментов: щелочная фосфатаза, аминопептидаза, трегалаза, сахараза, мальтаза, гликоамилаза. Разработка методов изоляции мембран микроворсинок тонкой кишки, получение микропузырьков в отдельной фракции [20, 37] позволили детально исследовать ферментный состав этих структур. По данным Kaziaki и соавт. [21], во фракциях, содержащих пузырьки, специфическая активность сахаразы и щелочной фосфатазы увеличивалась соответственно в 35,5 и 34 раза по сравнению с исходным гомогенатом соскоба слизистой оболочки кишки, активность К-зависимой АТФазы при этом понижалась в 10 раз. Следует обратить внимание на то, что в ряде работ проводится прямая параллель между очищенными пузырьками мембран микроворсинок во фракционированном состоянии и пузырьками, обнаруживаемыми в исчерченной каемке с помощью электронного микроскопа [20, 37 и др.]. Обе группы пузырьков обладают некоторыми общими признаками: окружены мембраной, структура которой напоминает плазмолемму энтероцитов; имеют незначительную электронную плотность содержимого; размеры их диаметра не превышают 80 нм. В то же время нельзя согласиться, что они содержат идентичный набор ферментов: фракция пузырьков, полученная в результате биохимической обработки соскоба слизистой оболочки, содержит ферменты мембраны исчерченной каемки на всем ее протяжении — ГП являются продуктом естественного процесса и должны содержать энзимы в конечной форме, характерной для высокофункциональных участков плазмолеммы достаточно дифференцированных энтероцитов.

Само собой всплывает предположение, что после отщепления и миграции в примембранное пространство ГП могут становиться дополнительными центрами мембранного гидролиза при том условии, что ферменты в их составе не теряют физиологической активности. Вместе с тем возникают вопросы. В какой мере ГП участвуют в пристеночном пищеварении? Сохраняют ли активность в ГП гликозилтрансферазы и другие ферменты, занимающие трансмембранную позицию? Сохранена ли функция ферментов в условиях деформированной вследствие предельной крутизны изгиба мембраны ГП?

Существуют и другие нерешенные вопросы. В частности, могут ли ГП осуществлять рецепторную или лигандную функцию по отношению к биосубстратам и т. п.? Есть основание считать, что рецепторные участки (сайты) плазмолеммы на поверхности ГП не претерпевают радикальных изменений: при обработке энтероцитов мышей холевой, дезоксихолевой и хенодезоксихолевой кислотами (0,2; 0,2; 0,6 ммоль/л соответственно) увеличивается количество холерного токсина, связывающегося с поверхностью клеток [22]. Можно предполагать, что это происходит вследствие увеличения поверхности плазмолеммы за счет ее пузырькования.

Мысль о том, что ГП — результат выделения «лишних» мембран в период их постоянного обновления, приводится в обзоре Marcus [23]. Не исключено, что усиление продукции ГП, наступающее после кормления голодающих животных, обусловлено именно этим эффектом.

При воздействии на слизистую оболочку кишек пороговых внешних раздражителей активизация выделительной функции энтероцитов может быть расценена как компенсаторная реакция клеток в рамках естественной функции микроворсинок. При увеличении силы раздражителя или длительности его приложения происходит поломка компенсаторно-приспособительного механизма, связанного с сократительными элементами микроворсинок [23, 29], и везикуляция их поверхности

уступает место грубому вздутию плазмолеммы, фрагментации исчерченной каемки, полному исчезновению микроворсинчатого аппарата. Нечто подобное наблюдается при длительном введении в организм лабораторных животных холевых соединений [15], при прекращении их воздействия «облысевшая» поверхность энтероцитов снова замещается микроворсинчатой структурой.

В целом создается впечатление, что регуляция экзоцитозной деятельности энтероцитов определяется местными факторами, действующими непосредственно на клеточные регуляторные системы. Вместе с тем получены отдельные факты, указывающие на существование органной регуляции выделения ГП. Так, введение крысам под кожу одномоментно четыреххлористого углерода из расчета 0,2 мл на 100 г животного активизировало экзоцитозную функцию энтероцитов [3]. Другой иллюстрацией органного контроля над ГП могут служить данные исследований биоптатов слизистой оболочки тонкой кишки пациентов с длительно существующими синдромом ее контаминации. Были обследованы 14 человек, которым 3—5 лет тому назад по поводу неспецифического язвенного колита была удалена толстая кишка и сформирована илеостома. Кусочки слизистой, взятые при контрольных осмотрах, готовили рутинными методами для просвечивающей электронной микроскопии; электронно-цитохимическое определение щелочной фосфатазы проводили по методу Hugon и Borgers [19] при pH 9,0.

В условиях постоянной колонизации поверхности слизистой оболочки тонкой кишки индигенной микрофлорой исчерченная каемка энтероцитов сохраняла обычную организацию с хорошо структурированным слоем пристеночных гликозаминогликанов, в то же время активность щелочной фосфатазы в ней была значительно ниже обычного, в равной мере была понижена экзоцитозная функция энтероцитов: если в обычных условиях в дистальном отделе тонкой кишки ГП обнаруживаются у 20 % энтероцитов, то при колонизации тонкой кишки индигенной микрофлорой — в 0,5—1 % клеток. Адаптация стенки тонкой кишки к новым условиям обеспечивается сложными органическими компенсаторными системами, влияние которых на эпителий частично проявляется в выключении процессов пристеночного пищеварения и транспортной функции энтероцитов. Об этом и свидетельствует снижение активности щелочной фосфатазы как показателя пищеварительно-всасывательной деятельности клеток на уровне исчерченной каемки [2, 17]; вероятным тестом этого состояния также может быть исчезновение в ней гликокаликсных пузырьков.

Таким образом, анализ данных, представленных в литературе, и результатов собственных исследований позволяет констатировать существование в системе микроворсинок энтероцитов физиологического процесса, обеспечивающего выведение ферментов, связанных с гликокаликсом, плазмолеммой и цитозолем, в пристеночное пространство. Процесс имеет определенные структурно-функциональные характеристики и может быть оценен с помощью биохимических, цитохимических и морфологических методов. Он приводит к созданию на поверхности энтероцита дополнительных свободно лежащих центров энзимного катализа. Структурный субстрат таких центров — гликокаликсные пузырьки, формирующиеся на поверхности исчерченной каемки. Есть основания предполагать, что гликокаликсные пузырьки участвуют в компенсаторно-приспособительных клеточных процессах, создавая какой-то резерв в системе пристенного и мембранного гидролиза.

V. K. Kovalchuk, [A. I. Korsunovsky]

GLYCOLALYX VESICLES OF ENTEROCYTES: ARE THEY A RESERVE OF MEMBRANE HYDROLYSIS?

Ultrastructural manifestation of the excretory enterocyte function is considered. The data on the nature and role of vesicles formed on the edge of these cells covered with lines are presented. The factors which influence their formation are discussed. Data

available in literature and results from the authors' observations on the stimulating effect of certain chemical substances on the formation of excretory vesicles named glycocalyx ones are analyzed. Information on their biochemical composition and certain cytochemical indices are presented. A supposition is advanced that glycocalyx vesicles being an expression of adaptation properties of cells can form additive active centres of the membrane and parietal hydrolysis in the area of the enterocyte edge covered with lines.

L. V. Gromashevsky Research Institute of Epidemiology and Infectious Diseases, Kiev

1. Елецкий Ю. К., Цибулевский А. Ю. Ультраструктурные и молекулярные основы транспорта веществ через щеточную каемку энтероцитов тонкой кишки // Успехи соврем. биологии. — 1979.—87, № 2. — С. 304—320.
2. Зуфаров К. А., Байбеков И. М., Ходжиметов А. А. Компенсаторно-приспособительные процессы в кишечнике. — М.: Медицина. — 207 с.
3. Ковальчук В. К. Структурно-функциональные особенности экзоцитоза эпителиоцитов кишечника // Арх. патологии. — 1985. — № 3. — С. 94.
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. Морозов И. А., Хвилья С. И., Лысков Ю. А. Ультраструктурные основы функционирования апикальной мембраны энтероцитов тонкой кишки // Третий Всесоюз. съезд гастроэнтерологов. — М.; Л., 1984, Ч. 2. — С. 62—64.
6. Морозов И. А., Лысков Ю. А. Электронно-микроскопическое исследование механизма кишечной секреции // Цитология. — 1985.—27, № 5. — С. 535—540.
7. Bennet G., Leblond C. C. Formation of cell coat material for the whole surface of columnar cells in the rat small intestine, as visualised by radiography with L-fucose ³H // J. Cell. Biol. — 1970.—46. — P. 409—416.
8. Biempica L., Sternlieb J., Sohn H. B. R-bodies of rectal epithelial cells // Arch. Pathol. Lab. Med. — 1976.—100, N 1. — P. 78—80.
9. Bossman B., Haschen R. J., Schmidt R., Linss W. Biochemische und morphologische Untersuchungen zum Einfluss von Gallensäuren auf das Epithel in Jejunum der Ratte // Acta histochem. — 1984.—74, N 2. — S. 217—237.
10. Brunser O. J., Luft H. Fine structure of the apex of absorptive cells from rat small intestine // J. Ultrastruct. Res. — 1970.—31. — P. 291—311.
11. David H., Uerling J. Elektronenmikroskopische Befunde am Dünndarm des Kaninchens nach Gefäßunterbindung // Exp. Pathol. — 1967.—185. — P. 77—83.
12. Dougherty W. Microblebs of intestinal epithelial cell microvilli of *Gitellus tridacem-blineatus* // Anat. Rec. — 1976.—185. — P. 77—83.
13. Forstner G. Contribution by surface enzyme to the intestinal glycoprotein surface coat // Clin. Res. — 1970.—18. — P. 724—729.
14. Gitzelman R., Bachi T. M., Binz H. et al. Localization of rabbit intestinal surface with ferritin antibody conjugates // Biochem. et Biophys. Acta (Amsterdam). — 1970.—196. — P. 20—28.
15. Gracey M., Papadimitrou J., Burke V. et al. Effects on small intestinal function and structure induced by feeding a conjugated bile acid // Gut. — 1973.—14. — P. 519—529.
16. Haase W., Schäfner R., Murer H. et al. Studies of the orientation of brush-border membrane vesicles // Biochem. J. — 1978.—171. — P. 57—62.
17. Healy P. J., Dinsdale D. Protein transmission in the intestine of the newborn lamb: the involvement of acid and alkaline phosphatase activity // Histochem. J. — 1979.—11. — P. 289—298.
18. Hobbs D. G. The origin and distribution of membrane-bound vesicles associated with the brush-border of chick intestinal mucosa // J. Anat. — 1980.—131. — P. 635—642.
19. Hugon J. S., Borgers J. A direct lead method for the electron microscopic visualization of alkaline phosphatase activity // J. Histochem. Cytochem. — 1966.—14. — P. 429—431.
20. Jacobs L. R. Biochemical and ultrastructural characterization of the molecular topography of the rat intestinal microvillous membrane. Asymmetric distribution of hydrophilic groups and anionic binding sites // Gastroenterology. — 1983.—85. — P. 46—54.
21. Kazuaki O., Kano A., Hoohi T. Purification of intestinal brush-borders membrane vesicles by the use of controlled-pore glassbead column // Life Sci. — 1979.—24. — P. 669—678.
22. Lange S., Hanson H. A., Löhnroth L. Influence of bile acids on cholera toxin-induced secretion in mouse jejunum // Acta pathol. microbiol. et immunol. Scand. — 1983.—91. — P. 215—220.
23. Marcus P. B. Glycocaliceal bodies and their role in tumor typing // J. Submicroscop. Cytol. — 1981.—13. — P. 483—500.
24. Michael E., Hodges R. D. Structure and histochemistry of normal intestine of the bowel. 1. The mature absorptive cells // Histochemical. J. — 1973.—5. — P. 313—333.
25. Millington P. F., Fineau J. B. Studies of effect of aminopterin on the small intestine of the rat. 1. The morphological changes following a single dose of aminopterin // Exp. Cell. Res. — 1962.—28. — P. 162—178.

26. Millington P. F., Fineau J. B. Electron microscope studies of the structure of the microvilli on principal epithelial cells of the rat jejunum after treatment in hypo- and hypertonic saline // J. Cell. Biol. — 1962.—14. — P. 125—139.
27. Misch D. W., Giebel P. E., Faust R. C. Intestinal microvillus structural alteration in response to physiological stimuli // J. Cell. Biol. — 1977.—75. — P. 393—398.
28. Misch D. W., Giebel P. E., Faust R. C. Intestinal microvilli: responses to feeding and fasting // Eur. J. Cell. Biol. — 1980.—21. — P. 269—279.
29. Mukherjee T. A., Williams A. W. A comparative study of the ultrastructural of microvilli in the epithelium of small and large intestine in mice // J. Cell. Biol. — 1967.—63. — P. 447—461.
30. Mukherjee T. A. The fine structural organization of the brush-border of intestinal epithelial cells // J. Cell. Sci. — 1971.—8. — P. 573—599.
31. Oda T., Seki S. Molecular structure and biochemical function of the microvilli membrane of intestinal epithelial cells with special emphasis on elementary particles // J. Electron. Microscop. — 1965.—14. — P. 210—217.
32. Ono K. Ultrastructure of the surface of principal cells of the rat large intestines of postnatal developing rat // Anat. Embriol. — 1976.—149. — P. 155—171.
33. Ono K. Absorption of the horseradish peroxidase by the principal cells of the large intestines of postnatal developing rat // Anat. Embriol. — 1977.—151. — P. 53—62.
34. Ozello L., Savary M., Roentlisberger B. Columnar mucosa of distal esophagus in patients with gastroesophageal reflux // Pathol. Ann. — 1977.—12(1). — P. 41—86.
35. Phillips A. D., France N. E. The structure of the enterocyte in relation to its position on the villus in childhood: an electron microscopical study // Histopathology.—1979.—3. — P. 117—130.
36. Pittman F. F., Pittman J. C. An electron microscopic study of the epithelium of normal sigmoid colonic mucosa // Gut. — 1966.—7. — P. 644—661.
37. Sigrist-Nelson K., Murer H., Hopfer U. Active alkaline transport on isolated brush-border membrane // J. Biol. Chem. — 1975.—250. — P. 5674—5680.
38. Stone J., Mukherjee T. A. C-bodies and R-bodies in the epithelial cells of normal and diseased human rectum // Arch. Pathol. and Lab. Med. — 1977.—101. — P. 437—441.
39. Walker W. A., Cornell R., Davenport L. M. et al. Macromolecular absorption mechanism of horse-radish peroxidase uptake and transport in adult and neonatal rat intestine // J. Cell. Biol. — 1972.—54. — P. 195—205.
40. Wooding F. B., Smith M. W., Greig H. The ultrastructural of the neonatal pig colon. // Amer. J. Anat. — 1978.—152. — P. 269—285.
41. Yamamoto M., Preslow B., Koch H. et al. Electron microscopic studies on the small intestinal mucosa of the rat after mechanical intestinal obstruction and ischemia // Virchows Arch., Abt. B, Cell pathol. — 1980.—32. — P. 157—164.

Киев. ин-т эпидемиологии и инфекц. болезней
им. Л. В. Громашевского МЗ УССР

Поступила 12.12.85