

Роль Na^+ , K^+ -АТФазы во взаимоотношениях тиамина и липоевой кислоты при всасывании, происходящем в желудочно-кишечном тракте мышей

Л. М. Карпов

Механизмы всасывания тиамина слизистой оболочкой желудочно-кишечного тракта (как человека, так и животных) изучены более, чем механизмы всасывания других витаминов. Установлены зависимость всасывания от доз [2, 14, 17], вклад в этот процесс простой диффузии и активного транспорта [8, 10, 19], взаимосвязь транспорта и фосфорилирования этого витамина в энтероцитах [11, 12]. В частности, показано, что активный транспорт тиамина в кишечнике *in vivo* наблюдается вплоть до концентраций 0,4—0,6 мкмоль/л [2, 19], при этом транспорт и фосфорилирование, по-видимому, не связаны между собой, т. е. белки-переносчики тиамина не обладают ТПФ-киназной активностью [11, 12], а витамин фосфорилируется уже внутри клеток кишечника (на 70—80 %) [16, 18]. И, наконец, за последнее десятилетие были обнаружены зависимость всасывания тиамина от Na^+ , K^+ -АТФазной активности мембран [15, 16, 20] и стимулирующее действие тиамина на активность этого фермента [3].

Что касается липоевой кислоты, то данные о механизмах ее всасывания весьма немногочисленны и в основном получены в нашей лаборатории. Так, установлено, что транспорт липоата через мембраны клеток слизистой оболочки аккумулирующих препаратов тонкой кишки крыс до 100 мкмоль/л, а тонкой кишки собак с фистулой до 200 мкмоль/л подчиняется кинетике Михаелиса—Ментен; при дальнейшем повышении концентрации наблюдается практически линейное возрастание всасывания [2, 7], что характерно для диффузии. При этом в опытах на собаках обнаружен предел всасывания липоата — 5 ммоль/л. Эти данные свидетельствуют в пользу существования нескольких механизмов транспорта липоевой кислоты через слизистую оболочку тонкой кишки, функционирование которых переключается в зависимости от концентрации. При низкой концентрации доказаны энергозависимость транспорта витамина (клетки аккумулирующих препаратов) и участие в нем АТФазы (эритроциты) [7].

Имеются веские аргументы в пользу наличия тесной функциональной и метаболической связи между тиамином и липоевой кислотой [1, 2, 9, 21]. Однако взаимоотношения их при всасывании изучены явно недостаточно. Так, на энтероцитах тонкой кишки крыс показано, что связывание ^{35}S -липоата уменьшается под влиянием тиамина [6]. В предыдущей нашей работе в опытах на фистульных собаках этот вопрос изучен более подробно [2].

Установлено, что характер взаимоотношений липоата и тиамина определяется соотношением их концентраций. В частности, соотношение 1:2,5 обеспечивало наибольшее всасывание каждого из этих витаминов. При других соотношениях всасывание в опыте даже ниже, чем в контроле.

В целом следует отметить, что влияние соотношения витаминов на характер их взаимоотношений при одновременном введении в организм (в том числе энтерально) изучено крайне недостаточно. Так, кроме уже названных выше работ, известна лишь одна работа [4], в которой установлено оптимальное соотношение (1:13) для всасывания витаминов B_1 и РР кишечником крыс. И, наконец, еще в 1957 г., изучая накопление в тканях этих же витаминов при их совместной инъекции, исследователи установили соотношение, близкое к выше указанному (1:10) [5].

Настоящая работа посвящена дальнейшему изучению взаимоотношений витамина В₁ и липоевой кислоты при всасывании, происходящем в желудочно-кишечном тракте, и роли в нем АТФаз.

Методика

Исследования проводили на мышах F₁ (СВА×Black) массой 18—20 г. Растворы витаминов вводили внутривентрикулярно с помощью зонда в объеме 0,4 мл, по схеме.

Первая серия опыта. К 20 мкмоль/кг ³⁵S-ЛК, введенной животным, добавляли по 20, 100 и 400 мкмоль/кг тиамина [Т]. При этом молярное соотношение (³⁵S-ЛК : Т) имело следующее цифровое выражение:

1 : 0

1 : 1

1 : 5

1 : 20

Вторая серия опыта. К 50 мкмоль/кг ³⁵S-Т, введенному животным, добавляли 2, 5, 10 и 50 мкмоль/кг липоевой кислоты (ЛК). При этом молярное соотношение ³⁵S-Т : ЛК имело следующий вид:

1 : 0

1 : $\frac{1}{20}$

1 : $\frac{1}{5}$

1 : 1

При этом на мышь массой 20 г дозы меченых витаминов составляли: для ³⁵S-ЛК — 80 мкг (20 мкмоль/кг), для ³⁵S-Т — 340 мкг (50 мкмоль/кг). Эти дозы и их соотношения выбраны нами на основании данных, установленных в предыдущих исследованиях [2]. В опыт животных брали через 30 мин и измеряли уровень радиоактивности ³⁵S-ЛК и ³⁵S-Т (сумма радиоактивных метаболитов) на 4π-радиометре «Протока» по принятой методике [2] в крови, печени, почках, желудке, двенадцатиперстной кишке, тонкой кишке, а также в суммарном содержимом желудка и тонкой кишки. В работе использован ³⁵S-тиамин фирмы «Amersham International», ³⁵S-липоат синтезирован нами (чистоту проверяли хроматографически и по биологической активности).

Одновременно в слизистых оболочках желудка, тонкой и двенадцатиперстной кишки определяли Mg²⁺- и Na⁺, K⁺-АТФазную активность, используя среду следующего состава (ммоль/л): трис-НСl (рН 7,4) — 20, MgCl₂ — 2, NaCl — 100, KCl — 10, АТФ — 4. Инкубировали 15 мин при 37 °С, затем определяли Р_i [13], Na⁺, K⁺-АТФазную активность вычисляли по разности между активностью общей и активностью Mg²⁺-АТФазы, которую определяли в среде того же состава, но в присутствии 10⁻⁴ моль/л строфантина К. Белок в пробах определяли по Лоури.

Результаты и их обсуждение

После введения ³⁵S-липовой кислоты (серия I) наибольший уровень радиоактивности был обнаружен в стенке желудка, далее по убывающей следовали печень, почки, стенки двенадцатиперстной кишки, тонкой кишки и кровь (табл. 1). Введение тиамина и ³⁵S-ЛК в эквивалентной ему дозе (1 : 1) вызывает во всех случаях снижение уровня радиоактивности, в том числе и в содержимом исследуемых отделов желудочно-кишечного тракта (ЖКТ). Из этого следует, что такое сочетание двух витаминов стимулирует всасывание ³⁵S-ЛК, но не является оптимальным для удерживания ее в тканях.

Пятикратное повышение дозы тиамина приводит не только к дальнейшему существенному повышению всасывания ³⁵S-ЛК (радиоактивность содержимого ЖКТ значительно уменьшилась по сравнению с радиоактивностью при предыдущем соотношении), но и к резкому уве-

Таблица 1. Влияние различных доз тиамин (Т) на концентрацию ^{35}S -ЛК в некоторых органах и отделах желудочно-кишечного тракта (мкг/г ткани), а также в их содержимом (мкг), через 30 мин после их одновременного внутрижелудочного введения (n=8)

Объект исследования	Молярное соотношение ^{35}S -ЛК (20 мкмоль/кг) : Т			
	1 : 0	1 : 1	1 : 5	1 : 20
Кровь	1,53±0,18	1,24±0,14 P>0,05	3,56±0,49 P<0,002	0,97±0,12 P<0,05
Печень	10,01±0,74	8,46±1,14 P>0,04	20,24±3,05 P<0,05	9,93±1,02 P>0,05
Почки	8,87±0,49	7,96±0,60 P>0,05	14,43±0,97 P<0,01	6,45±0,91 P>0,05
Желудок	29,35±3,18	17,68±1,83 P<0,05	50,60±4,37 P<0,001	28,46±3,82 P>0,05
Двенадцатиперстная кишка	4,30±0,28	2,35±0,26 P<0,002	5,13±0,73 P>0,05	3,88±0,59 P>0,05
Тонкая кишка	2,12±0,17	1,74±0,16 P>0,05	4,51±0,58 P<0,005	0,46±0,11 P<0,001
Содержимое желудка	4,91±0,47	3,03±0,56 P>0,05	2,59±0,98 P>0,05	7,43±0,67 P<0,03
Содержимое двенадцатиперстной кишки	0,74±0,15	0,4±0,08 P>0,05	0,23±0,08 P<0,03	0,35±0,07 P<0,05
Содержимое тонкой кишки	5,53±0,47	1,8±0,30 P<0,001	1,30±0,28 P<0,001	2,03±0,27 P<0,001

Таблица 2. Влияние различных доз липоевой кислоты (ЛК) на концентрацию ^{35}S -Т в некоторых органах и отделах желудочно-кишечного тракта (мкг/г ткани), а также в их содержимом (мкг) через 30 мин после одновременного внутрижелудочного введения (n=8)

Объект исследования	Молярные соотношения ^{35}S -Т (50 мкмоль/кг) : Т			
	1 : 1	1 : $\frac{1}{20}$	1 : $\frac{1}{5}$	1 : 1
Кровь	2,60±0,33	2,59±0,19 P>0,05	3,23±0,24 P>0,05	1,97±0,27 P>0,05
Печень	4,84±0,37	4,61±0,27 P>0,05	6,76±0,22 P<0,05	5,26±0,39 P>0,05
Почки	6,10±0,45	5,31±0,36 P>0,05	11,50±0,56 P<0,001	10,59±1,13 P<0,001
Желудок	9,64±1,20	12,56±0,77 P>0,05	10,06±1,32 P>0,05	11,94±1,38 P>0,05
Двенадцатиперстная кишка	15,67±1,03	13,45±1,09 P>0,05	12,25±1,38 P>0,05	15,12±1,58 P>0,05
Тонкая кишка	56,47±3,37	64,71±3,23 P>0,05	44,73±3,40 P<0,05	66,07±4,81 P>0,05
Содержимое желудка	23,68±2,05	57,97±7,71 P<0,001	12,35±2,38 P<0,001	12,04±1,36 P<0,001
Содержимое двенадцатиперстной кишки	4,52±0,48	9,48±1,18 P<0,001	3,78±0,40 P>0,05	3,60±0,34 P>0,05
Содержимое тонкой кишки	154,20±7,96	136,01±8,67 P>0,05	106,03±6,21 P<0,001	168,32±10,3 P>0,05

личению ее уровня в органах и тканях: в 2—2,5 раза. Дальнейшее увеличение дозы тиамин (до двадцатикратной) практически дает тот же результат, что и при эквимольном соотношении. Таким образом, соотношение ЛК : Т=1:5 можно считать оптимальным для всасывания и поступления липоата в органы и ткани.

При введении животным ^{35}S -тиамин (серия 2) получены другие закономерности распределения метки (табл. 2). Наибольшая радиоактивность обнаружена в стенке тонкой кишки, далее по убывающей следовали стенки двенадцатиперстной кишки, желудка, затем уже ткани почки, печени и кровь. Более половины препарата не успевало

всасываться за 30 мин и оставалось в содержимом ЖКТ. Особенно существенен остаток в тонкой кишке. Это подтверждает результаты наших предыдущих исследований, показавших, что липоевая кислота всасывается быстрее, чем тиамин [2], причем в большей (если не в большей) мере в верхних отделах ЖКТ.

Введение смеси ^{35}S -Т и ЛК в наименьшей дозе (1/20, см. табл. 2) незначительно влияло на поступление тиамина в органы и ткани, но вызывало заметное перераспределение метки в содержимом ЖКТ: в верхних отделах кишечника всасывание замедлялось, а в тонкой кишке — ускорялось. При повышении дозы ЛК до 1/5 дозы Т всасывание ^{35}S -Т из просвета ЖКТ резко возрастало, что выражалось в согласованном и отчетливом падении радиоактивности содержимого и стенок всех исследуемых отделов ЖКТ и в увеличении количества меченого тиамина в крови, печени и почках.

Дальнейшее увеличение дозы липоевой кислоты, до эквимольной по отношению к тиамину, практически не повлияло на содержание метки в содержимом желудка и двенадцатиперстной кишки и в стенках этих отделов. В просвете тонкой кишки радиоактивность заметно возрастает, что свидетельствует о некотором замедлении всасывания, с чем согласуется снижение уровня ^{35}S -Т в крови, печени и почках.

При изучении всасывания ^{35}S -Т обращает на себя внимание наличие заметной корреляции изменений количества метки в просвете и изменений количества метки в стенках изученных отделов ЖКТ, что особенно выражено для тонкой кишки. Для ^{35}S -ЛК такой закономерности не наблюдали: содержание ^{35}S в стенках ЖКТ изменялось так же, как в других изученных органах, т. е. в этом случае к 30-й минуте в стенках, по-видимому, обнаруживали, в основном, то количество меченого витамина, которое задерживалось клетками, а не то, которое находилось в процессе транспортирования.

Несмотря на то, что доза ^{35}S -Т (мкмоль/кг) была в 2,5 раза выше, инъекции ^{35}S -ЛК вызывали такую же или даже более высокую радио-

Таблица 3. Активность Mg^{2+} -АТФазы (I) и Na^+ , K^+ -АТФазы (II) печени и слизистой оболочки некоторых отделов желудочно-кишечного тракта (мкмоль Р/мг белка $\cdot \text{ч}^{-1}$) через 30 мин после внутрижелудочного введения ^{35}S -ЛК (20 мкмоль/кг) в разных соотношениях с тиаминном (n=8)

Объект исследования	Контроль	Молярное соотношение ^{35}S -ЛК : Т			
		1 : 0	1 : 1	1 : 5	1 : 20
Слизистая оболочка желудка					
I	25,22±0,18	20,44±0,16 P<0,001	16,81±0,11 P<0,001	19,81±0,17 P<0,001	27,63±0,19 P<0,01
II	5,20±0,16	4,08±0,15 P<0,001	4,42±0,16 P<0,001	6,01±0,07 P<0,001	3,59±0,3 P<0,001
Слизистая оболочка двенадцатиперстной кишки					
I	19,08±0,42	17,16±0,26 P<0,05	17,53±0,40 P>0,05	16,84±0,60 P>0,05	20,78±0,42 P>0,05
II	5,95±0,16	3,97±0,09 P<0,001	5,85±0,20 P>0,05	6,99±0,21 P<0,01	2,87±0,12 P<0,001
Слизистая оболочка тонкой кишки					
I	26,48±0,37	33,84±0,88 P<0,001	29,30±0,52 P<0,001	18,42±0,17 P<0,001	35,04±0,22 P<0,001
II	3,33±0,38	4,54±0,21 P<0,02	5,23±0,69 P<0,05	7,80±0,11 P<0,01	3,17±0,48 P<0,05
Печень					
I	27,51±0,24	31,16±0,16 P<0,001	27,70±0,18 P>0,05	28,50±0,23 P<0,05	29,30±0,18 P<0,001
II	9,60±0,18	4,63±0,12 P<0,001	3,90±0,12 P<0,001	4,18±0,08 P<0,05	9,05±0,16 P>0,05

активность (повышение общего меченого витамина) в крови, печени и почках (см. табл. 1 и 2), что убедительно говорит о большей скорости всасывания липоевой кислоты, особенно в верхних отделах ЖКТ. Полученные результаты свидетельствуют о наличии оптимального соотношения доз в смеси ЛК и Т (1:5 или близкое к этому), при котором быстрее всасывается каждый из витаминов. Однако тиамин сильнее влияет на всасывание липоата, чем наоборот, что уже отмечено нами ранее в опытах на собаках [2].

Одновременно было изучено влияние внутрижелудочного введения разных соотношений липоевой кислоты и тиамина на активность Mg^{2+} -АТФазы и Na^+ , K^+ -АТФазы разных отделов ЖКТ и печени. Результаты представлены отдельно (табл. 3 и 4).

При введении мышам только ^{35}S -липоевой кислоты активность Mg^{2+} -АТФазы снижалась в слизистых оболочках желудка и двенадцатиперстной кишки, но повышалась в тонкой кишке и печени. Активность Na^+ , K^+ -АТФазы возрастала только в слизистой оболочке тонкой кишки, во всех других объектах она существенно уменьшалась (в печени — даже более чем в 2 раза).

Введение животным смеси ^{35}S -ЛК с Т при меньших его дозах (соотношение 1:1 или 1:5) во всех случаях подавляло активность Mg^{2+} -АТФазы, но увеличивало ее при высоких (всегда — при соотношениях 1:20 и иногда — при соотношении 1:5). Характер изменений Na^+ , K^+ -АТФазы был другим. При меньших дозах Т (соотношение 1:1) в большинстве объектов (кроме печени) намечалась тенденция к возрастанию (или к восстановлению по сравнению с контролем) ее активности. При соотношении 1:5 она достигала максимума, превышающего и контроль, и вариант с индивидуальным введением ^{35}S -ЛК; лишь в печени рост активности продолжался и до соотношения 1:20.

При введении животным в желудок одного лишь меченого Т активность Mg^{2+} - и Na^+ , K^+ -АТФазы изменялась в основном так же, как и после введения ^{35}S -ЛК, но в несколько меньшей степени (см. табл. 4).

Т а б л и ц а 4. Активность Mg^{2+} АТФазы (I) и Na^+ , K^+ -АТФазы (II) печени и слизистой оболочки некоторых отделов желудочно-кишечного тракта (мкмоль P_i /мг белка $\cdot$ ч $^{-1}$) через 30 мин после внутрижелудочного введения ^{35}S -Т (50 мкмоль/кг) в разных соотношениях с липоевой кислотой (n=8)

Объект исследования	Контроль	Молярное соотношение ^{35}S -Т : ЛК			
		1:0	1: $\frac{1}{20}$	1: $\frac{1}{5}$	1:1
Слизистая оболочка желудка					
I	21,76 $\pm$ 0,15	19,08 $\pm$ 0,27 P<0,001	19,87 $\pm$ 0,27 P<0,001	20,77 $\pm$ 0,1 P>0,05	14,01 $\pm$ 0,77 P<0,001
II	3,15 $\pm$ 0,08	2,92 $\pm$ 0,11 P>0,05	3,07 $\pm$ 0,17 P>0,05	3,31 $\pm$ 0,14 P>0,05	1,92 $\pm$ 0,16 P<0,001
Слизистая оболочка двенадцатиперстной кишки					
I	17,16 $\pm$ 0,45	16,50 $\pm$ 0,12 P>0,05	16,00 $\pm$ 0,57 P>0,05	14,38 $\pm$ 0,87 P<0,03	15,95 $\pm$ 0,44 P>0,05
II	4,76 $\pm$ 0,38	5,48 $\pm$ 0,11 P<0,05	5,57 $\pm$ 0,16 P>0,05	5,93 $\pm$ 0,41 P<0,05	3,14 $\pm$ 0,28 P<0,05
Слизистая оболочка тонкой кишки					
I	18,32 $\pm$ 0,48	22,14 $\pm$ 0,25 P<0,05	30,50 $\pm$ 1,07 P<0,001	29,31 $\pm$ 0,82 P<0,001	25,17 $\pm$ 0,93 P<0,001
II	3,00 $\pm$ 0,39	3,71 $\pm$ 0,26 P>0,05	4,53 $\pm$ 0,17 P<0,01	4,37 $\pm$ 0,21 P<0,05	4,05 $\pm$ 0,24 P>0,05
Печень					
I	28,84 $\pm$ 0,47	29,76 $\pm$ 0,16 P>0,05	30,01 $\pm$ 1,58 P>0,05	29,37 $\pm$ 1,08 P>0,05	32,7 $\pm$ 1,16 P>0,05
II	7,21 $\pm$ 0,41	3,84 $\pm$ 0,16 P<0,001	6,27 $\pm$ 0,32 P>0,05	6,07 $\pm$ 0,39 P>0,05	5,90 $\pm$ 0,30 P<0,03

Введение смеси ^{35}S -Т и ЛК в возрастающих дозах приводило к существенному увеличению активности Mg^{2+} -АТФазы (наибольшему при соотношении 1:1/20). В других объектах изменения были незначительными и лишь в слизистых оболочках желудка (соотношение 1:1) и двенадцатиперстной кишки (1:1/5) отмечено ее заметное угнетение.

Во всех случаях активность Na^+ , K^+ -АТФазы была самой высокой при соотношениях 1:1/20 и 1:1/5 и лишь в печени она все же не достигала контрольного уровня. При введении эквимольной смеси витаминов (см. табл. 4, соотношение 1:1) активность во всех объектах снижалась, но особенно в слизистых желудка и двенадцатиперстной кишки.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что интенсивность всасывания липоевой кислоты и тиаминa зависит от их соотношения: она максимальна для каждого из витаминов при соотношении ЛК : Т = 1:5, при других пропорциях всасывание было, как правило, более слабым, чем при индивидуальном их введении. Обнаруженные закономерности особенно отчетливы при действии различных доз Т на всасывание ^{35}S -ЛК, что подтверждает полученные ранее данные в опытах на собаках [2]. Показано также, что соотношение между витаминами, обеспечивающее их максимальное всасывание, сопровождается и наибольшей активизацией Na^+ , K^+ -АТФазы в слизистых оболочках ЖКТ. Активность Mg^{2+} -АТФазы изменялась в основном незначительно и какой-либо ее корреляции с интенсивностью всасывания обнаружить не удалось.

Выводы

1. Всасывание липоевой кислоты и тиаминa при их одновременном введении в желудок белых мышей (в пределах терапевтических доз) максимально при соотношении 1:5.
2. При этом соотношении активность Na^+ , K^+ -АТФазы слизистых оболочек желудочно-кишечного тракта достигала наибольшего значения.
3. Зависимости между изменениями активности Mg^{2+} -АТФазы и интенсивности всасывания витаминов не обнаружено.
4. Полученные результаты свидетельствуют о наличии общего механизма всасывания липоевой кислоты и тиаминa, связанного с Na^+ , K^+ -АТФазной активностью.

THE ROLE OF Na^+ , K^+ -ATPASE IN THIAMINE AND LIPOIC ACID RELATIONSHIPS UNDER ABSORPTION IN THE STOMACH-INTESTINE TRACT

L. M. Karpov

^{35}S -lipoic acid (20 $\mu\text{mol/kg}$) with different doses of thiamine or ^{35}S -thiamine (50 $\mu\text{mol/kg}$) with unlabelled lipoic acid were administrated to the white mice stomach. It was established that absorption and entrance of both lipoic acid and thiamine when they were in 1:5 quantities in organs and tissues were maximal. The activity of Na^+ , K^+ -ATPase determined in stomach, duodenum and small intestine was the maximal too.

I. I. Mechnikov University, Ministry of Higher and Secondary Special Education of the Ukrainian SSR, Odessa

1. Анисимов В. Е. Биохимия и клиническое применение липоевой кислоты (витамин N). — Казань: Изд-во Казан. ун-та, 1969.—198 с.
2. Карпов Л. М., Розанов А. Я., Файтельберг Р. О. и др. Взаимодействие липоевой кислоты и тиаминa при всасывании в тонком кишечнике собак // Физиол. журн.—1985.—31, № 6.—С. 750—753.
3. Кирилук А. Г. Всасывание тиаминa и никотиновой кислоты в кишечнике: Автореф. дис. ... канд. мед. наук.—Киев, 1977.—18 с.
4. Кирилук А. Г., Хмелевский Ю. В. Механизмы взаимодействия витаминов B_1 и РР при всасывании в кишечнике крыс // Вопр. мед. химии.—1978.—24, № 1.—С. 67—73.