

Н. Н. ПЕЗУИТОВА, Г. Г. ЩЕРБАКОВ, Р. И. КУШАК
член-корреспондент АН СССР А. М. УГОЛЕВ

**ДИПЕПТИДАЗНАЯ И ИНВЕРТАЗНАЯ АКТИВНОСТИ
КИШЕЧНЫХ КЛЕТОК И ИХ ГОМОГЕНАТОВ НА РАЗНЫХ УРОВНЯХ
СИСТЕМЫ КРИПТА — ВОРСИНКА ТОНКОЙ КИШКИ**

Многие важные характеристики пищеварительных и резорбтивных функций тонкой кишки не могут быть поняты без уточнения функциональной топографии системы крипта — ворсинка*, которая, по-видимому, должна рассматриваться как определенная структурно-функциональная единица. В первом приближении неравноценность различных отделов этой системы обусловлена тем, что образование клеточного материала происходит в криптах, причем по мере миграции клеток в направлении верхушек ворсинок имеет место их дифференциация (см. обзоры (1-4)). Имеющиеся сведения в некоторой степени позволяют представить себе изменения различных характеристик кишечного эпителия при его продвижении от крипт к верхушкам ворсинок. В частности, при гистохимическом исследовании локализации некоторых дисахаридаз и щелочной фосфатазы в слизистой тонкой кишки обнаружено, что в крипальной области ворсинок эти ферменты отсутствуют или присутствуют в значительно меньших количествах, чем в апикальной ((5, 6) и др.). Отмечено также, что по мере дифференциации клеточных элементов увеличивается длина и число микроворсинок на единицу поверхности (7, 8).

Существенный прогресс был достигнут недавно благодаря работам Далквиста и его сотрудников (9, 10), исследовавших распределение различных ферментов (ряда дисахаридаз, дипептидаз и щелочной фосфатазы) в гомогенатах кишечных клеток, полученных на разных уровнях СКВ. Эти данные, однако, не позволяют дать характеристику микро топографии собственно пищеварительных функций системы, так как ранее было показано, что промежуточные и заключительные стадии гидролиза пищевых биополимеров осуществляются той частью ферментов, которая локализована на поверхности мембран микроворсинок (мембранное, или пристеночное, пищеварение) (см. обзоры (1, 2, 11, 12)). Сопоставление активности интактных клеток и их гомогенатов на разных уровнях СКВ может являться важным показателем функционального состояния тонкой кишки (1, 2, 13, 14), так как интенсивность мембранного пищеварения определяется не только механизмами, обеспечивающими синтез соответствующих ферментов, но и механизмами, реализующими включение последних в состав липо-протеиновых комплексов мембраны микроворсинок. В связи с этим в настоящей работе была сделана попытка при помощи специальной техники охарактеризовать как общий запас ферментов в кишечных клетках на разных уровнях СКВ, так и долю ферментов, участвующих в мембранном пищеварении. Первое достигалось исследованием ферментативной активности гомогенатов, второе — интактных кишечных клеток.

Методика. В экспериментах были использованы полоски (длиной 3 см) проксимального отдела тонкой кишки 16 голодных белых крыс линии Вистар. При помощи особого методического приема осуществлялось выравнивание уровня верхушек ворсинок и замораживание ткани кишки в таком положении. Далее приготавливались срезы толщиной 50 м (для определения дипептидазной активности) и 100 м (для определения инвертазной актив-

* В дальнейшем система крипта — ворсинка будет обозначаться СКВ.

ности), из которых последовательно одни исследовались интактными, другие — гомогенизированными. Более тонкие срезы в данном случае были нерациональны, так как это должно было привести к увеличению числа первично поврежденных клеток.

Определялась активность дипептидазы (глицил-*l*-лейцилдипептидазы, 3. 4. 3. 2) и инвертазы (3. 2. 1.26), которая выражалась в милли- и микромолях образующихся продуктов гидролиза соответствующих субстратов

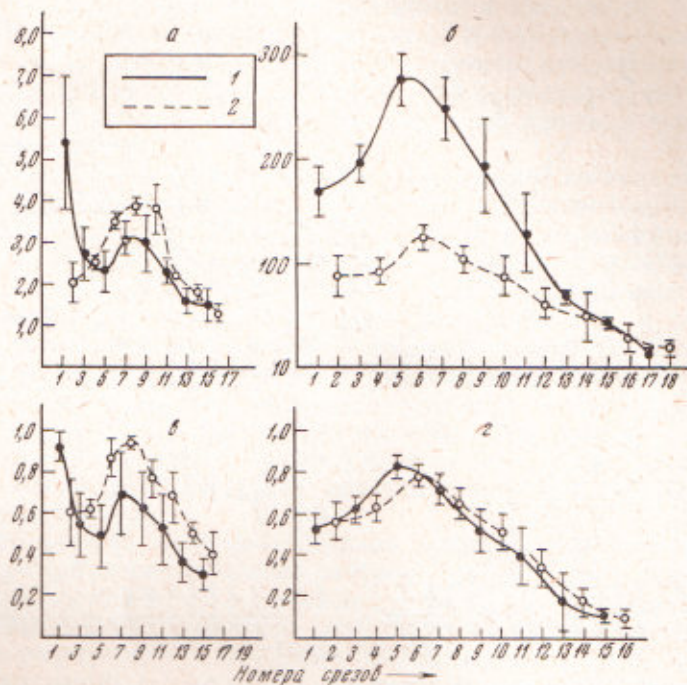


Рис. 1. Распределение дипептидазной (а, в) и инвертазной (б, г) активностей в интактных (1) и гомогенизированных (2) клетках СКВ тонкой кишки белых крыс. Нумерация срезов в направлении от верхушек ворсинок к криптам. Активность дипептидазы и инвертазы выражена в mM (а) и μM (б) продуктов гидролиза, образующихся за 1 мин., и в условных единицах, где максимальная ферментативная активность в каждом эксперименте принималась за 1 (в, г) ($\bar{x} \pm S_x$)

за 1 мин. Первоначально была получена характеристика ферментативной активности на единицу длины (т. е. 50 или 100 μ), а затем производился расчет на 100 мг влажного веса ткани. Далее по максимальной активности интактного среза или гомогената, принятой за 1, вычислялась активность ферментов всех других срезов или гомогенатов.

Для идентификации отдела ворсинок проводился специальный морфологический контроль на окрашенных срезах и при помощи фазово-контрастной микроскопии, который показал в ряде случаев фиксацию ворсинок в наклонном положении, что значительно искажало результаты. В представленной работе учитывались данные лишь тех экспериментов, которые были получены на препаратах с вертикально расположенными ворсинками.

Результаты. Обращает на себя внимание тот факт, что распределение дипептидазы и инвертазы вдоль ворсинок тонкой кишки белых крыс не идентично. При исследовании дипептидазной активности гомогенатов (рис. 1а, б), полученных на разных уровнях СКВ, обнаружено, что активность была наибольшей в средней части ворсинок и заметно снижалась как в апикальном, так и крипальном направлениях. Таким образом, концентрация глицил-*l*-лейцилдипептидазы и, вероятно, других дипепти-

даз возрастает в кишечных клетках по мере их дифференциации и, достигнув максимума в средней части ворсинок, затем достоверно снижается.

Дипептидазная активность интактных кишечных клеток в базальных областях и средней части ворсинок первоначально возрастала параллельно активности гомогенатов, хотя была и несколько ниже ее. Однако в апикальной зоне ворсинок несмотря на снижение общей активности гомогенатов, дипептидазная активность поверхности (после некоторого снижения),

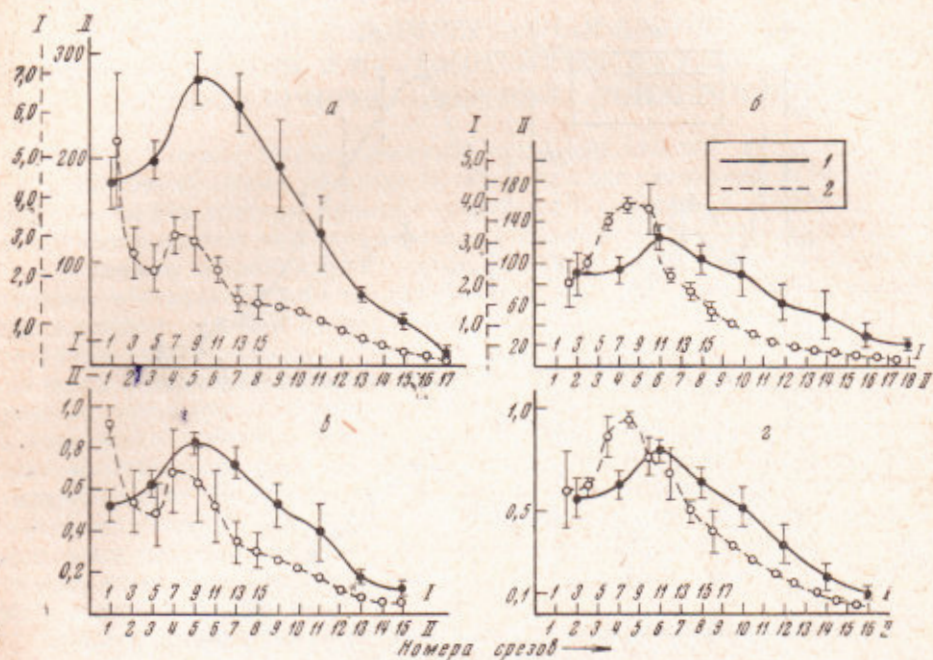


рис. 2. Сопоставление инвертазой (I) и дипептидазной (2) активностей в интактных (а, б) и гомогенизированных (б, г) клетках на разных уровнях СКВ. Активность дипептидазы и инвертазы выражена в mM (I) и μM (II) продуктов гидролиза, образующихся за 1 мин. (а, б), и в условных единицах, где максимальная активность в каждом эксперименте принималась за 1 (в, г) ($\bar{x} \pm S_x$)

напротив, резко повышалась, достигая максимума. Активность этого фермента в крипальной области была чрезвычайно низка, что показано в нескольких дополнительных экспериментах (рис. 2).

На рис. 1 б, г представлено распределение инвертазной активности в гомогенатах и интактных клетках тонкой кишки на всех уровнях СКВ. Как можно видеть, в обоих случаях концентрация инвертазы возрастала в направлении от крипт примерно к середине ворсинок, а далее заметно и достоверно снижалась. В отличие от дипептидазной активности, активность инвертазы на всех уровнях СКВ была значительно выше в интактных клетках, чем в их гомогенатах. Подобное явление в отношении дипептидазы наблюдалось лишь в области верхушек ворсинок.

Итак, при исследовании распределения дипептидазной и инвертазной активностей интактных и гомогенизированных клеток на разных уровнях СКВ было обнаружено несколько новых фактов.

Прежде всего следует отметить отсутствие строгой корреляции между ферментативной активностью гомогенатов и интактных клеток слизистой тонкой кишки. Такое несоответствие подтверждает то обстоятельство, что определение активности гомогенатов не позволяет судить об интенсивности собственно пищеварительных функций кишечных клеток в различных отделах СКВ. Анализ динамики процессов синтеза белка и механизмов образования фермент-мембранных комплексов с включением их в состав мембран микроворсинок позволяет думать, что в базальных частях

ворсинок, в относительно более глубоких отделах крипт, преобладают процессы синтеза. Эти данные согласуются, в частности, с наблюдениями К. Г. Газаряна и А. С. Кульминской⁽¹⁵⁾, показавших, что именно в крипталльной области имеет место наиболее интенсивный синтез информационной РНК и протеосинтез. Возможно, путем изменения соотношений между процессами синтеза соответствующих ферментов и включением их в состав мембран кишечных клеток в определенной степени осуществляется регуляция уровня мембранного пищеварения и транспорта. Несоответствие ферментативной активности гомогенатов и интактных кишечных клеток может иметь значение в клинике. В частности, при некоторых формах патологии тонкой кишки на фоне нормальной ферментативной активности гомогенатов имеет место значительное снижение пищеварительных функций кишечных клеток^(1, 2, 13, 16).

Полученные нами данные, по всей вероятности, позволяют думать об известной специализации клеток, находящихся в различных зонах ворсинок. Действительно, как было отмечено ранее, распределение ферментативной активности вдоль ворсинок тонкой кишки не идентично. Особенно заметно это различие в верхних отделах ворсинок, где дипептидазная активность интактных клеток оказывалась максимальной, а инвертазная, напротив, снижалась (рис. 2). Таким образом, по аналогии с проксимодистальным градиентом распределения ферментативной активности тонкой кишки, возможно существование крипталльно-апикального градиента. Изменение последнего приводит к значительным сдвигам ферментативного спектра слизистой и может рассматриваться как один из механизмов, обеспечивающих ферментативные адаптации тонкой кишки (популяционные адаптации).

В экспериментах, приведенных выше, существенный интерес представляет феномен «гиперактивности», который был обнаружен ранее в некоторых опытах, поставленных в нашей лаборатории⁽⁴⁾. Он заключается в том, что ферментативная активность интактных кишечных клеток, характеризующая интенсивность мембранного пищеварения, в ряде случаев превышает активность гомогенатов — показателя, свидетельствующего об общем запасе ферментов в клетках. Снижение ферментативной активности при гомогенизации, возможно, может быть обусловлено частичным или полным разрушением ультраструктуры щеточной каймы, фермент-мембранных комплексов и, следовательно, изменением конформации ферментативно-активных молекул, а также нарушением определенной организации ферментных систем поверхности и условий, которыми характеризуются ферментативные процессы на границе фаз мембрана — жидкость. Нельзя также исключить того обстоятельства, что уменьшение ферментативной активности при гомогенизации связано с освобождением из внутриклеточной среды веществ, обладающих свойствами специфических ингибиторов. Механизм этого явления будет рассмотрен в специальных работах.

Институт физиологии им. И. П. Павлова
Академии наук СССР
Ленинград

Поступило
26 I 1969

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- 1 А. М. Уголев, Физиология и патология пристеночного пищеварения, Л., 1967.
- 2 A. M. Ugolev, *Physiology and Pathology of Membrane Digestion*, N. Y., 1968.
- 3 J. S. Trier, *Federat. Proc.*, 25, 1391 (1967). 4 J. S. Trier, *Handb. of Physiol.*, 3, 1125 (1968). 5 J. Jos, J. Frezal et al. *Nature*, 213, 516 (1967). 6 H. A. Padykula, *Federat. Proc.*, 21, 873 (1962). 7 Р. А. Бродский, *Арх. анат., гистол. и эмбриол.*, 42, 92 (1962). 8 Р. А. Бродский, *Матер. симп. Физиол. и патол. всасывания в жел.-киш. тракте*, Одесса, 1964, стр. 150. 9 A. Dahlqvist, C. Nordstrom, *Biochim. et biophys. acta*, 113, 624 (1966). 10 C. Nordstrom, A. Dahlqvist, L. Josefsson, *J. Histochem. and Cytochem.*, 15, 713 (1967). 11 А. М. Уголев, Пристеночное (контактное) пищеварение, Л., 1963. 12 А. М. Уголев, *Physiol. Rev.*, 45, 555 (1965). 13 А. М. Уголев, Н. Н. Иезуитова и др., *ДАН*, 166, 472 (1965). 14 Н. Н. Иезуитова, Т. Я. Надирова и др., *Тр. по медицине*, 18, Тарту, 1968, стр. 230. 15 К. Г. Газарян, А. С. Кульминская, *Структура, свойства и генетич. функция ДНК*, Конфер. Радиобиол. отдела Инст. атомн. энергии им. Курчатова, 1966, стр. 285. 16 Р. И. Гаврилов, В. Ю. Даманский, *Радиобиология*, 6, в. 3, 394 (1966).