

УДК 616.341:612.332:616.001.28) – 092.4/9

## СТАНОВЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ МЕМБРАННЫХ ФЕРМЕНТОВ В ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ ТОНКОЙ КИШКИ КРЫСЯТ ПРИ ДЛИТЕЛЬНОЙ ИНКОРПОРАЦИИ РАДИОНУКЛИДОВ

В.В. Воробьев, к.б.н., доцент

Кафедра анестезиологии и реаниматологии с курсом клинической биохимии  
УО «Гродненский государственный медицинский университет»

*В экспериментальных исследованиях установлено, что длительная инкорпорация радионуклидов  $^{137}\text{Cs}$  и  $^{90}\text{Sr}$  приводит к нарушению естественного становления активности дисахаридаз и щелочной фосфатазы в эпителиальных клетках тонкой кишки в процессе постнатального развития крыс. В этих условиях происходит изменение ферментативных градиентов вдоль оси крипта-ворсинка. Наиболее существенные отклонения отмечаются в период перехода животных от молочного питания к смешанному.*

**Ключевые слова:** инкорпорация радионуклидов, тонкая кишка, энтероциты, мембранные ферменты.

*The experimental studies have shown that long term incorporation of radionuclides  $^{137}\text{Cs}$  and  $^{90}\text{Sr}$  results in disturbance of natural dynamics of disaccharidase and alkaline phosphatase activity in epithelial cells of small intestine during rat postnatal development. Under these conditions there is some change in enzyme gradients along the crypt-villus axis. The most serious deviations have been noticed during substituting of milk feeding for mixed feeding.*

**Key words:** incorporation of radionuclides, small intestine, enterocytes, membrane enzymes.

Загрязнения окружающей среды, продуктов питания, питьевой воды радиоактивными веществами создает реальные предпосылки для длительного проникновения радионуклидов в организм человека и развития в нем различных патологических процессов. Эпидемиологические исследования последних лет показывают, что в структуре заболеваемости существенный удельный вес занимают болезни органов пищеварения [4]. Однако из-за значительных методических трудностей в клинических условиях сложно всесторонне исследовать морфофункциональное состояние различных отделов тонкого кишечника, изучить возможные механизмы радиационно-индуцированных отклонений. Поэтому особый интерес приобретает моделирование аналогичных состояний на животных. В нашей лаборатории ранее была изучена активность ферментов мембранного пищеварения в различных отделах тонкой кишки крыс, употреблявших радиоактивный корм [1]. Показано, что длительное оральное поступление радионуклидов вызывает разнообразные перестройки структурно-функционального состояния различных отделов тонкой кишки. Отмечается значительное нарушение активности гидролитических ферментов – мальтазы, сахаразы, щелочной фосфатазы, гамма-глутамилтранспептидазы, изменения проксимально-дистальной топографии ферментов, скорости и характеристик транспорта ряда нутриентов [2].

Вместе с тем, известна высокая радиочувствительность тканей организма на ранних стадиях

онтогенеза млекопитающих. При переходе от молочного питания к дефинитивному у животных наблюдаются значительные перестройки важнейших характеристик функциональной биохимии пищеварительного тракта, затрагивающие клеточный, субклеточный и молекулярный уровни [3], что делает эту систему в ранний период развития особенно уязвимой к различным факторам агрессии. Можно предположить, что воздействие ионизирующей радиации способно нарушить процесс естественного становления специфических пищеварительно-транспортных систем тонкой кишки. Учитывая клеточный полиморфизм слизистой оболочки, обосновано исследование функциональной специализации эпителиальных клеток кишечника.

Цель настоящей работы заключалась в оценке особенностей становления активности мембранных ферментов в энтероцитах ворсинок и крипт тощей кишки крысят раннего возраста при инкорпорации радионуклидов.

### Материалы и методы

Опыты выполнены на белых беспородных крысах, составивших 2 группы: 1-я – контроль, получали обычное зерно вивария, 2-я – опыт, получали радиоактивное зерно, содержащее  $^{137}\text{Cs}$  (427,7 Бк/кг) и  $^{90}\text{Sr}$  (97,7 Бк/кг). Показатели радиоактивности корма у контрольных животных были в 15-16 раз ниже. На первом этапе эксперимента крысы-самки двух групп в течение всего периода беременности и лактации получали рацион соответствующего типа. На втором этапе, после прекращения

молочного питания, крысята переводились на рацион, содержащий (для опытных групп) или не содержащий (для контрольных групп) радионуклиды.

Крысят в возрасте 15, 45, 90 дней после эфирного наркоза декапитировали. Изолировали отрезок тощей кишки и получали изолированные энтероциты крипт и ворсинок. Эти возрастные группы животных были выбраны в связи с тем, что для каждой из них четко дифференцирован тип питания (молочный и дефинитивный, соответственно). Гомогенат клеток, приготовленный на 0.9% NaCl, центрифугировали при 1500 г в течение 10 минут. В супернатанте определяли активность лактазы, инвертазы и щелочной фосфатазы.

Мембраны щеточной каемки выделяли методом, основанным на преципитирующем действии CaCl<sub>2</sub> [7]. В стандартном эксперименте у 2 – 3 крысят изолировали тощую кишку, промывали охлажденным 0,9% NaCl и отделяли слизистую оболочку. Полученную ткань суспендировали в среде, состоящей из 60 мл 300 мМ маннитола, 12 мМ трис-HCl pH – 7,1 и 240 мл ледяной дистиллированной воды в соотношении ткань : среда (мл) как 1 : 30. Далее гомогенизировали в течение 3 мин при 4° С в блендере MPW – 302 (Польша) при максимальной скорости оборотов. В гомогенат вносили 1 М CaCl<sub>2</sub> до конечной концентрации 10 мМ. Через 15 мин гомогенат центрифугировали при 3000 г в течение 15 мин. Осадок отбрасывали, супернатант центрифугировали 30 мин при 27000 g. Полученный на этой стадии осадок ресуспендировали в 60 мМ маннитоле и 12 мМ трис-HCl, pH – 7,1, при соотношении исходная ткань : среда(мл) как 1 : 6 и гомогенизировали в течение 1 мин при 4° С. В гомогенат вносили 1 М CaCl<sub>2</sub> до конечной концентрации 10 мМ и через 15 мин центрифугировали при 3000 г в течение 15 мин. После устранения осадка супернатант повторно центрифугировали при 27000 g 30 мин. Супернатант отбрасывали, а осадок ресуспендировали в 30 мл 20 мМ трис-Нерес буферном растворе (pH – 7,4), содержащем 280 мМ маннитол и центрифугировали 30 мин при 40000 g. Для получения мембранных везикул щеточной каемки осадок суспендировали в среде, состоящей из 10 мМ трис-Нерес буферного раствора, pH – 7,5 и 280 мМ маннитола из расчета 4 – 6 мг белка на 1 мл и далее пропускали через инъекционную иглу калибром 25 G. Препарат мембран на данном этапе выделения отличался достаточно высокой степенью чистоты. Кратность обогащения, рассчитанная из значений удельной активности сахаразы, приближалась к 20. Полученные результаты обработаны методами вариационной статистики.

### Результаты и обсуждение

Показано, что у 15-дневных крысят в период молочного кормления в клетках крипт и ворсинок обнаруживается высокая лактазная и крайне низкая сахаразная активность (таблица 1). При этом отмечается незначительный нисходящий ворсинко-криптальный градиент уровня лактазы (соотношение активности в клетках ворсинок и крипт равно 1,28 : 1,0). В условиях инкорпорации радиоизотопов в обоих типах клеток зафиксирована уменьшенная, по отношению к контролю, активность лактазы с сохранением ворсинко-криптального градиента. После прекращения молочного кормления (на 30 день постнатального развития) происходит постепенное снижение лактазной активности. К 45 суткам уровень лактазы, по отношению к 15-дневным крысятам, уменьшен как в энтероцитах крипт, так и ворсинок крыс обеих групп. Однако степень падения уровня лактазы у крысят, употребляющих радиоактивный корм, менее существенна в сравнении с контрольной группой.

Лактаза – фермент, играющий особо важную роль в период молочного питания. Следует отметить, что в слизистой оболочке тонкой кишки крыс и человека обнаружены три типа лактазы, но только один из них присутствует в мембранах щеточной каймы энтероцитов. Здесь лактаза представ-

**Таблица 1** – Активность мембранных ферментов в изолированных энтероцитах тонкой кишки крысят различного возраста в условиях длительной инкорпорации радионуклидов

Возраст крыс	Группа крыс	Клетки ворсинок	Клетки крипт
Лактаза (нмоль/мин/мг белка)			
15 дней	Контроль	123,7 ± 17,9	96,6 ± 12,9
	Радионуклиды	65,9 ± 10,0*	41,5 ± 8,1*
45 дней	Контроль	18,0 ± 1,1	16,8 ± 2,0
	Радионуклиды	29,7 ± 3,1*	19,3 ± 1,9
90 дней	Контроль	3,32 ± 0,56	3,20 ± 0,49
	Радионуклиды	3,69 ± 0,68	3,15 ± 0,51
Сахараза (нмоль/мин/мг белка)			
15 дней	Контроль	0,68 ± 0,18	3,93 ± 2,6
	Радионуклиды	0,72 ± 0,30	3,53 ± 1,45
45 дней	Контроль	242,1 ± 25,2	476,2 ± 29,7
	Радионуклиды	152,8 ± 19,6*	241,2 ± 23,1*
90 дней	Контроль	250,9 ± 19,4	177,8 ± 14,1
	Радионуклиды	204,2 ± 14,6*	182,1 ± 23,4
Щелочная фосфатаза (мкмоль/мин/мг)			
15 дней	Контроль	3,20 ± 0,98	2,89 ± 1,02
	Радионуклиды	4,02 ± 1,68	3,44 ± 1,25
45 дней	Контроль	3,63 ± 0,48	2,78 ± 0,58
	Радионуклиды	1,17 ± 0,22*	0,47 ± 0,06*
90 дней	Контроль	4,64 ± 0,39	1,80 ± 0,22
	Радионуклиды	3,63 ± 0,47	2,74 ± 0,61

\* - P < 0,05 при сравнении с контролем

лена в виде лактазно-флоридзин-гидролазного комплекса, состоящего из двух субъединиц. Молекулярная масса этого фермента изменяется в зависимости от возраста и отдела тонкой кишки [5]. Авторы объясняют это незрелостью подвздошной кишки, в которой обнаружено более длительное присутствие силовых кислот в молекуле лактазы. Однако они не связывают возрастзависимое изменение активности лактазы с процессами десикализации и фукозилирования фермента в процессе постнатального развития. Эта разница полностью отсутствует у взрослых крыс. Наши результаты свидетельствуют о нарушении естественного становления активности лактазы в ранний постэмбриональный период развития в условиях инкорпорации радионуклидов. Далее, после прекращения молочного кормления, происходит быстрая деградация лактазы, что сопровождается исчезновением различий в активности фермента в различных типах энтероцитов. Однако у крыс, получавших радионуклиды, катаболизм фермента несколько замедляется. В процессе взросления животных (90 суток) происходит дальнейшее значительное снижение активности лактазы и наблюдается исчезновение различий в активности фермента в энтероцитах крыс контрольной и опытной групп.

Результаты определения сахаразы существенно отличались от таковых для лактазы (таблица 1). В ранний постэмбриональный период развития (15 дней) в эпителиальных клетках тонкой кишки регистрируется низкий уровень данного фермента, активность же сахаразы в низкодифференцированных клетках крипт в 4,9-5,5 раза выше, чем в высокоспециализированных энтероцитах ворсинок. Эти результаты свидетельствуют, что на стадии молочного питания индукция синтеза фермента только начинается и, возможно, поэтому влияние радионуклидов не зафиксировано. При переходе к дефинитивному питанию активность сахаразы к 45 суткам повышается в 50-60 раз. Это увеличение наблюдается во всех типах энтероцитов, но активность фермента в крипах по-прежнему превышает таковую в ворсинках. Вместе с тем, инкорпорация радионуклидов вызвала изменение матурации сахаразы, что проявилось более низкими значениями ферментативной активности в обоих типах клеток. К 90 дню постнатального развития в эпителиальных клетках тонкой кишки контрольных крыс формируется нисходящий градиент сахаразной активности. В опытной группе на данной стадии онтогенеза практически не наблюдается различий в уровне сахаразы между энтероцитами крипт и ворсинок. В то же время, индукция сахаразы у крыс, потреблявших радионуклиды, суще-

ственно замедлена.

При определении активности щелочной фосфатазы выявлена высокая активность фермента в энтероцитах тонкой кишки во все изученные периоды онтогенеза крыс. Однако наиболее существенным признаком матурации этой ферментной системы при переходе от молочного питания к дефинитивному было формирование ворсинко-крипального градиента активности. Так, у крысят в возрасте 15, 45 и 90 дней активность щелочной фосфатазы в высокоспециализированных клетках ворсинок превышала таковую в низкодифференцированных клетках крипт, соответственно, в 1,1; 1,3 и 2,6 раза.

В условиях инкорпорации радионуклидов становление ворсинко-крипального индекса активности щелочной фосфатазы замедляется. К 90-му дню постнатального развития животных этот показатель в опыте был равен 1,3.

Все исследованные ферменты относятся к мембраносвязанным ферментам, поскольку у взрослых животных большая часть их активности обнаруживается в мембранной фракции. Уровни ферментной активности в значительной степени характеризуют структурно-функциональное состояние мембраны щеточной каемки тонкой кишки. Однако в начальный период постнатального развития кишечные ферменты присутствуют как в мембранной, так и растворимой фракции клетки. Наличие растворимой формы пищеварительных ферментов в раннем онтогенезе является свидетельством структурно-функциональной незрелости тонкой кишки, что подтверждается существенным снижением доли растворимой формы мембраносвязанных ферментов при переходе к дефинитивному питанию и, кроме того, может рассматриваться как адаптивный признак, способствующий выживанию и развитию организма [3]. Изменение соотношения двух форм ферментов в сторону уменьшения доли растворимой формы при матурации тонкой кишки указывает на различие физиологической роли каждой из форм в период раннего онтогенетического развития. Высокая активность растворимой формы мембраносвязанных ферментов в раннем постнатальном возрасте, по-видимому, необходима для ассимиляции пищевых субстратов, которые могут поступать внутрь энтероцитов из-за повышенной проницаемости мембран щеточной каймы [3]. Исходя из полученных результатов, важно было выяснить, в какой степени нарушения становления кишечных ферментов в энтероцитах при инкорпорации радионуклидов были связаны с изменением активности их мембраносвязанных форм.

**Таблица 2** – Активность ферментов в мембране щеточной каемки тонкой кишки крысят различного возраста при инкорпорации радионуклидов

Ферменты	Возраст, единицы активности	Контроль	Радионуклиды
Лактаза	15 дней (мкмоль/мин/мг белка)	2,18 ± 0,18	1,57 ± 0,10*
	45 дней (нмоль/мин/мг белка)	69,7 ± 18,2	80,8 ± 19,0
Щелочная фосфатаза	15 дней (мкмоль/мин/мг белка)	7,42 ± 0,73	5,20 ± 0,27*
	45 дней (мкмоль/мин/мг белка)	4,22 ± 0,54	1,62 ± 0,23*

\* -  $P < 0,05$  при сравнении с контролем

С помощью дифференциального центрифугирования получены мембранные фракции щеточной каемки тонкой кишки крысят и определена активность исследуемых ферментов (таблица 2). Мембранная фракция щеточной каемки энтероцитов 15-дневных крысят содержит значительные количества лактазы и щелочной фосфатазы. Удельные активности данных ферментов существенно превышают таковые в изолированных клетках ворсинок и крипт, что согласуется с данными о преобладании мембраносвязанных форм кишечных ферментов в период раннего онтогенеза животных. Эта особенность сохраняется и на 45-й день постнатального развития.

Динамика естественной матурации ферментов мембранной фракции в онтогенезе в экспериментальных группах совпадает по направленности с изменениями в изолированных энтероцитах, но является более демонстративной. В частности, обращает на себя внимание резкое снижение (в 31,3 раза) активности лактазы в щеточной каемке при переходе крысят от молочного питания (15 дней) к дефинитивному (45 дней). Длительное воздействие малых доз радиации вызывает уменьшение количества мембраносвязанных лактазы и щелочной фосфатазы, что подтверждается более низкими активностями ферментов (таблица 2). Однако активность лактазы щеточной каемки в раннем онтогенезе (15-дневные и 45-дневные крысята) при инкорпорации радионуклидов уменьшается лишь в 19,4 раза, что, возможно, связано с нарушением последней стадии биогенеза кишечных ферментов – включения в структуру апикальной мембраны энтероцита [6].

### Заключение

При длительной инкорпорации радионуклидов происходит замедление становления карбогидразных активностей и щелочной фосфатазы, которое в конечном итоге приводит к изменениям естественного распределения ферментов в энтероцитах системы ворсинка-крипта. Можно полагать, что внутреннее облучение тканей тонкой кишки в малых дозах вызывает нарушение биогенеза специфических ферментных систем на различных стадиях дифференцировки и функциональной специализации эпителиальных клеток при их миграции из зоны крипт к верхней части ворсинок. Радиационно-индуцированные изменения ферментных активностей в период раннего постнатального развития наиболее существенны в мембране щеточной каемки тонкой кишки. Представленные результаты исследования свидетельствуют о высокой радиочувствительности специфических молекулярных систем в мембранах энтероцитов тонкой кишки на ранних стадиях онтогенеза млекопитающих.

### Литература

1. Воробьев, В.В. Проксимальнодистальная топография кишечных гидролаз при энтеральном поступлении радионуклидов / В.В. Воробьев, В.В. Лелевич // Медицинские новости. – 1999. – № 7. – С. 44-46.
2. Воробьев, В.В. Характеристики транспорта глюкозы и аланина мембранными везикулами щеточной каемки тонкой кишки крыс при инкорпорации радионуклидов / В.В. Воробьев // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2007. – № 4. – С. 20-22.
3. Соотношение мембранной и растворимой форм кишечных ферментов в онтогенезе крыс / В.В. Егорова [и др.] // Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова. – 1998. – № 1-2. – С. 82-87.
4. Сосновская, Е.Я. Состояние здоровья населения Республики Беларусь, пострадавшего от катастрофы на Чернобыльской АЭС / Е.Я. Сосновская. – Гомель: ГУ РНПЦ РМ и ЭЧ, 2006. – 250 с.
5. Glycosylation of lactase-phlorizin hydrolase in rat small intestine during development / H.A. Buller [et al.] // Gastroenterology. – 1990. – V. 98. – № 3. – P. 667-675.
6. Effect of external abdominal irradiation on intestinal morphology and brush border membrane enzyme and lipid composition / M. Keelan [et al.] // Radiation Research. – 1986. – V. 105. – P. 84-98.
7. Kessler, M. A modified procedure for the rapid preparation of efficiently transporting vesicles from small intestinal brush border membranes / M. Kessler, O. Acuto, C. Storelli // Biochim. Biophys. Acta. – 1978. – V. 506. – P. 136-154.

Поступила 28.10.08