

## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ПЕРЕНОСЧИКОВ SGLT1 И GLUT2 В ЭНТЕРОЦИТАХ ТОНКОЙ КИШКИ КРЫСЫ И КЛЕТКАХ Caco2 ПРИ ВСАСЫВАНИИ ГЕКСОЗ

© Н. М. Грэфнер,<sup>1</sup> Л. В. Громова,<sup>2</sup> А. А. Груздков,<sup>2</sup> Я. Ю. Комиссарчик<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт цитологии РАН и <sup>2</sup>Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН, Санкт-Петербург;  
электронный адрес: grefner@mail.cytspb.rssi.ru

Авторами оценено распределение переносчиков гексоз SGLT1 и GLUT2 в энтероцитах изолированного участка кишки в условиях хронического опыта и в культуре клеток Caco2 после всасывания гексоз при их высоких и низких концентрациях. Установлено, что в энтероцитах переносчик SGLT1 локализован по краю кишечной ворсинки. Переносчик GLUT2 после нагрузки высокими концентрациями растворов гексоз локализован в апикальной части клетки, что свидетельствует о его участии в транспорте сахаров через апикальную мембрану. Клетки Caco2 в культуре формируют характерные для энтероцитов микроворсинки и соединительный комплекс. При инкубировании культуры в растворах глюкозы и галактозы наблюдали поглощение этих сахаров из инкубационной среды. Переносчик SGLT1 в клетках Caco2 находится в апикальной и околоядерной частях клетки и организован в глобулы. Переносчик GLUT2 после нагрузки гексозами при низких концентрациях сосредоточивается в базальной области клетки. Культура клеток Caco2 может служить моделью для изучения транспорта сахаров в кишечном эпителии.

Ключевые слова: конфокальная и электронная микроскопия, энтероцит, Caco2, SGLT1, GLUT2, гексозы.

Современные представления о механизмах всасывания гексоз в энтероцитах тонкой кишки млекопитающих обобщены в ряде обзоров (Тимофеева и др., 2000; Ferraris, 2001; Kellett, Brot-Laroche, 2005; Drozdowski, Thomson, 2006). Согласно классической модели всасывания гексоз в тонком кишечнике, глюкоза и галактоза переносятся через апикальную мембрану энтероцита с помощью Na-зависимого транспортера SGLT1, а выводятся из клетки в кровяное русло общим для большинства гексоз переносчиком облегченной диффузии GLUT2. Эта модель вполне адекватна для случаев, когда концентрация глюкозы и галактозы в просвете кишки меньше, чем в клетке. При этом активный переносчик SGLT1 работает против градиента концентрации.

В конце 1980-х годов американские ученые (Pappenheimer, Reiss, 1987) обратили внимание на то, что в физиологических условиях (в отсутствие наркоза и операционной травмы) при высоких углеводных нагрузках скорость всасывания глюкозы в тонкой кишке в несколько раз превышает значения максимальной скорости ее активного транспорта, определенные в опытах *in vitro* и в острых опытах *in vivo* на анестезированных животных. Этими авторами была предложена гипотеза о парацеллюлярном переносе глюкозы через плотные контакты на потоке всасываемой жидкости. Предполагалось, что парацеллюлярный перенос особенно эффективен в отношении транспорта глюкозы, образующейся при мембранном гидролизе олигосахаридов (Pappenheimer, 2001). Однако, как было показано нами ранее (Громова, Груздков, 1993; Gro-mova, Gruzdkov, 1999; Груздков, Громова, 2001), а также

другими исследователями (Lane et al., 1999; Cheeseman, 2002), в широком диапазоне концентраций мальтозы в полости кишки парацеллюлярный перенос образующейся глюкозы, по-видимому, составляет лишь весьма незначительную долю от ее суммарного всасывания. Нам не удалось также подтвердить результаты электронно-микроскопического анализа (Madara, Pappenheimer, 1987), касающиеся структурных изменений плотных контактов при всасывании больших концентраций глюкозы (Ugolev et al., 1995; Комиссарчик и др., 2003).

В последние годы группа Келлета предложила новую модель всасывания гексоз, в которую включен трансцеллюлярный пассивный компонент (Helliwell et al., 2000; Kellett, Helliwell, 2000; Kellett, 2001). Согласно этой модели, при всасывании высоких концентраций глюкозы в апикальную мембрану включается пассивный переносчик GLUT2. Перемещение GLUT2 из внутриклеточного пула и встраивание его в мембрану щеточной каймы запускаются SGLT1-зависимой активацией протеинкиназы C (PKC) и MAP-киназного сигнального пути.

Следует отметить, что участие указанных переносчиков в трансмембранном переносе гексоз изучается преимущественно на изолированных препаратах тонкой кишки или в условиях острого опыта на анестезированных животных. В то же время указанные условия изменяют процессы всасывания и соответственно работу переносчиков. В лаборатории физиологии питания Института физиологии им. И. П. Павлова РАН разработана методика изучения механизмов мембранного гидролиза и всасывания пищевых веществ в изолированной петле кишечника

на не анестезированных животных в хроническом опыте (Уголев, Зарипов, 1979), т. е. в условиях, близких к физиологическим. Ранее нами была исследована локализация транспортера GLUT2 в энтероцитах тонкой кишки крысы при всасывании глюкозы в условиях хронического опыта (Грефнер и др., 2006; Громова и др., 2006). Полученные в этих работах результаты в основном укладывались в вышеприведенную модель группы Келлета (Kellett, Helliwell, 2000; Kellett, 2001).

В настоящее время в качестве модели энтероцитов все шире используют клетки Caco2 из карциномы ободочной кишки. Эти клетки при выращивании культуры образуют конфлюэнтный слой, поляризуются и формируют микроворсинки на апикальной поверхности и плотные контакты между клетками на базолатеральной мембране (Pinto et al., 1983; Blais et al., 1987). В клетках Caco2 обнаружены переносчики SGLT1 и GLUT2 (Mahraoui et al., 1994). Однако немногочисленные данные о локализации этих переносчиков в клетках Caco2 касаются только SGLT1 (Kipp et al., 2003; Khoursandy et al., 2004). Поэтому перед нами стояла задача изучить локализацию переносчиков SGLT1 и GLUT2 в клетках Caco2 при нагрузке гексозами и сопоставить это распределение с таковым в энтероцитах тонкой кишки крысы.

### Материал и методика

В экспериментах *in vivo* использовали самцов белых крыс линии Вистар с массой тела 180—200 г (питомник «Рапполово» РАН). Нагрузки нутриентами осуществляли путем перфузии изолированной петли тонкой кишки в условиях хронических опытов (Уголев, Зарипов, 1979). Изолированную петлю перфузировали в течение 1 ч раствором Рингера (pH 7.1—7.4) или растворами гексоз (глюкоза 50 мМ, галактоза 50 мМ), приготовленными на растворе Рингера, после чего крыс умерщвляли декапитацией. Для дальнейших морфологических исследований участки изолированной петли фиксировали 2%-ным раствором глутаральдегида на фосфатном буфере (PBS), постфиксировали 1%-ным раствором OsO<sub>4</sub> на том же буфере, обезвоживали в этиловом спирте и заливали в Эпон (Миранов и др., 1994). С помощью ультратомы Ultrotome III (LKB, Швеция) из образцов получали ультратонкие срезы, контрастировали их по 10 мин в цитрате свинца, уранил-ацетате и вновь в цитрате свинца, а затем изучали с использованием электронного микроскопа JEM—100U (JEOL, Япония).

Для исследования образцов с помощью конфокального микроскопа участки изолированной петли фиксировали 2%-ным формальдегидом на PBS 1 ч, пропитывали 30%-ным раствором сахарозы, которая служила криопротектором, и замораживали в изоктане, охлажденном жидким азотом. Образцы сохраняли при –30 °С. Срезы толщиной 7—10 мкм получали с помощью криостата Leica (Германия). Переносчики сахаров выявляли методом непрямой иммунофлуоресценции. Срезы пермеабилizировали 0.3%-ным Triton X-100 на PBS (буферный раствор А) в течение 20 мин. Неспецифическое связывание иммуноглобулинов блокировали 3 % BSA на буферном растворе А в течение 1 ч. В качестве первых антител использовали поликлональные козы антитела к SGLT1 и кроличьи к GLUT2 (Santa Cruz Biotechnology Inc., США) в разведении 1 : 1000 буферным раствором А с 0.5%-ным BSA. С первыми антителами срезы инкубировали в течение

ночи при 4 °С, после чего срезы промывали 4 раза по 10 мин в буферном растворе А с 0.5%-ным BSA. В качестве вторых антител использовали антикозьи иммуноглобулины, конъюгированные с флуоресцентным красителем Alexa Fluor 633, и антикроличьи иммуноглобулины, конъюгированные с флуоресцентным красителем Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, США) в разведении 1 : 500 буферным раствором А с 0.5%-ным BSA, которыми окрашивали срезы в течение 2 ч при комнатной температуре. После этого срезы промывали 4 раза по 30 мин в буферном растворе А с 0.5%-ным BSA. Срезы, заключенные в глицерин, анализировали с помощью конфокального микроскопа Zeiss LSM 5 Pascal с аргоновым и гелий-неоновым лазерами (Carl Zeiss, Германия).

Клетки Caco2 для экспериментов *in vitro* были получены из Коллекции культур клеток позвоночных Института цитологии РАН. Клетки были посеяны в пластиковые флаконы объемом 25 см<sup>2</sup> (для физиологических экспериментов) и на покровные стекла в чашках Петри диаметром 10 мм (для иммуноцитохимии). Клетки выращивали в течение 21 дня в среде DMEM с добавлением 10 % бычьей эмбриональной сыворотки. Клетки инкубировали при 37 °С и 5 % CO<sub>2</sub> в атмосфере. Среду во флаконах и чашках Петри меняли на свежую 1 раз в 2 дня.

Всасывание глюкозы или галактозы определяли у прикрепляющихся ко дну флакона клеток. Инкубационная среда содержала (в мМ): 137 NaCl, 4.7 KCl, 1.2 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2 MgSO<sub>4</sub>, 2.5 CaCl<sub>2</sub>, 10 буфер-HEPES (pH 7.2), 4 глутамин и 2.5 глюкозы (галактозы). Пассивный компонент транспорта субстрата определяли в присутствии в инкубационной среде флоридзина 0.2 мМ, блокирующего адсорбцию клетками сахаров переносчиком SGLT1. Перед опытом монослой клеток во флаконе промывали дважды 1 мл среды без субстрата и 1 раз 1 мл среды с субстратом, а затем инкубировали с 1 мл среды с субстратом при 37 °С. Через 60 мин инкубационную среду полностью удаляли для определения в ней концентрации субстрата, а к клеткам добавляли 1 мл охлажденной до 4 °С инкубационной среды без субстрата и соскабливали их. Образовавшуюся суспензию использовали для определения в ней концентрации белка. Концентрацию глюкозы определяли глюкозооксидазным методом (Dahlqvist, 1964), галактозы — антроновым методом (Scott, Melvin, 1953), а белка — методом Лоури (Lowry et al., 1951). Поглощение субстрата определяли по его убыли в инкубационной среде и выражали в мкмоль на 1 мг белка за 60 мин.

Клетки в чашках Петри инкубировали таким же образом, как и во флаконах. После нагрузки субстратами (глюкоза, галактоза) клетки на стеклах фиксировали 2%-ным раствором формальдегида на PBS в течение 10 мин. Переносчики сахаров выявляли в клетках с помощью иммуномечения так же, как на срезах кишечника. Препараты анализировали с применением конфокальных микроскопов Zeiss LSM5 Pascal (Carl Zeiss, Германия) и Leica TCS SL (Leica, Германия).

Для определения локализации фибриллярного актина клетки пермеабилizировали буферным раствором А в течение 10 мин, окрашивали родамин-фаллоидином на буферном растворе А в разведении 1 : 100 в течение 30 мин и отмывали PBS 4 раза по 10 мин. Препараты заключали в глицерин и анализировали с помощью конфокального микроскопа Leica TCS SL (Leica, Германия).

Для электронно-микроскопических исследований использовали часть монослоя, выросшего на дне чашек Петри. Клетки фиксировали 2%-ным раствором глутаральде-

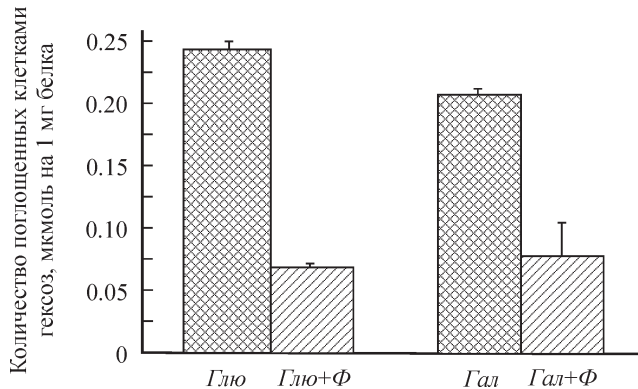


Рис. 1. Поглощение клетками Caco2 глюкозы (2.5 мМ) и галактозы (2.5 мМ) в присутствии и в отсутствие флоридзина (0.2 мМ).

Глю — поглощение глюкозы, Глю + Ф — поглощение глюкозы в присутствии флоридзина, Гал — поглощение галактозы, Гал + Ф — поглощение галактозы в присутствии флоридзина.

гида 30 мин, затем 1%-ным раствором OsO<sub>4</sub> 30 мин. Фиксированные клетки снимали с поверхности чашек Петри, обезвоживали и заключали в эпон. Далее из блоков с образцами изготавливали ультратонкие срезы, которые контрастировали уранил-ацетатом и цитратом свинца по 10 мин. Изучение ультратонких срезов проводили с помощью электронного микроскопа, как описано выше.

## Результаты

Всасывание глюкозы и галактозы энтероцитами и клетками Caco2. Используемые нами подходы для анализа механизмов всасывания глюкозы и галактозы энтероцитами тонкой кишки крысы в хроническом эксперименте и полученные с их помощью данные подробно представлены в нашей предыдущей статье (Громова и др., 2006). При изучении всасывания гексоз культивируемыми клетками были использованы в основном те же подходы.

Результаты исследования всасывания глюкозы и галактозы клетками Caco2 из инкубационной среды представлены на рис. 1. На гистограмме видно, что через 60 мин инкубации происходит убыль глюкозы и галактозы из инкубационной среды. При добавлении в инкубационную среду флоридзина в концентрации 0.2 мМ поглощение гексоз значительно снизилось.

Электронная микроскопия энтероцитов и клеток Caco2. Электронно-микроскопические картины исследованных энтероцитов тонкой кишки крысы демонстрируют типичное для этих клеток строение: на апикальной поверхности клетки расположены многочисленные микроворсинки, корневые нити которых соединены с терминальной сетью (рис 2, а). В околоядерной области расположены цистерны аппарата Гольджи. В некоторых клетках в апикальной и околоядерной областях встречаются многочисленные пузырьки. Хорошо выявляются цитоскелетные элементы — микрофиламенты и микротрубочки. Наиболее четко они представлены в терминальной сети. На представленных фотографиях видны межклеточные контакты и подходящие к ним микрофиламенты и промежуточные фибриллы (рис. 2, б). При всасывании исследуемых гексоз мы не обнаружили существенных изменений в общем плане строения энтероцитов.

Клетки Caco2 на 21-е сут культивирования формировали конфлюэнтный монослой. При исследовании культуры в электронном микроскопе (рис. 3) было обнаружено, что клетки Caco2, так же как и энтероциты, на апикальной поверхности имеют микроворсинки. Терминальная сеть в использованных нами клетках Caco2 не выявлялась. В цитоплазме наблюдались цистерны аппарата Гольджи и хорошо развитая эндоплазматическая сеть. Соединительный комплекс представлен плотными контактами и десмосомами.

Конфокальная микроскопия. Распределение переносчиков гексоз в энтероцитах. С помощью конфокального микроскопа проведен иммуноцитохимический анализ распределения переносчиков глюкозы и галактозы в энтероцитах тонкой кишки крысы. Локализацию Na-зависимого переносчика SGLT1 определяли после нагрузки тонкой кишки раствором Рингера

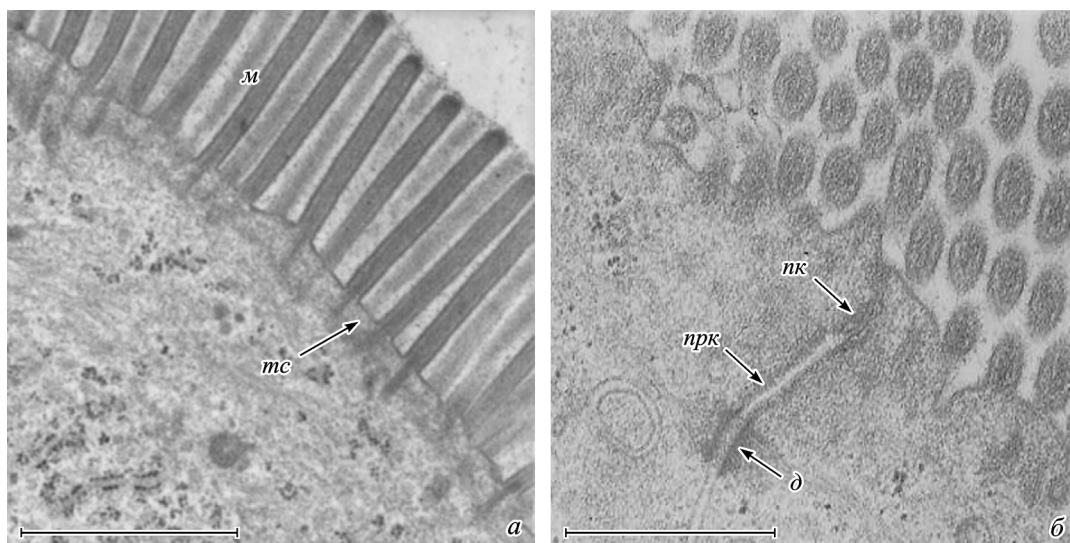


Рис. 2. Энтероцит крысы.

а — апикальная область клетки, б — соединительный комплекс. м — микроворсинки, tc — терминальная сеть, pk — плотный контакт, prk — промежуточный контакт, d — десмосома. Масштабные отрезки — 1 мкм.



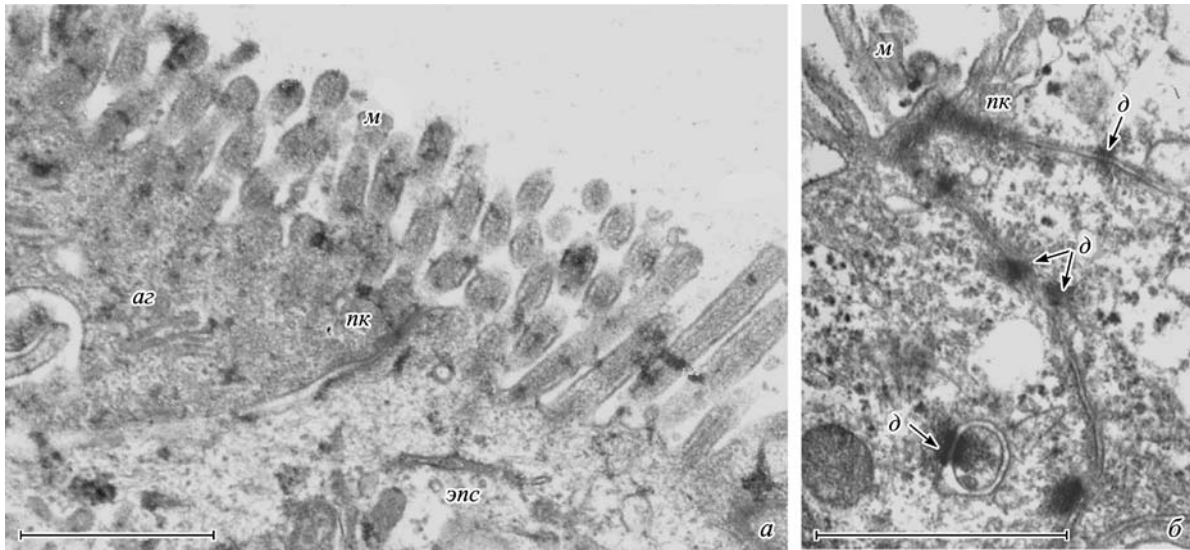


Рис. 3. Клетка Caco2 на 21-е сут культивирования.

*a* — апикальная область клетки, *б* — соединительный комплекс. *м* — микроворсинки, *пк* — плотный контакт, *д* — десмосомы, *аг* — аппарат Гольджи, *эпс* — эндоплазматическая сеть. Масштабные отрезки — 1 мкм.

или раствором глюкозы в концентрации 50 мМ (рис. 4). В обоих случаях переносчик выявлялся по краю кишечной ворсинки, где флуоресцентная метка формировалась в небольшие глобулы. Некоторое количество SGLT1 присутствовало и в цитоплазме энтероцитов.

Анализ локализации переносчика GLUT2 после нагрузки глюкозой при высоких концентрациях (50 мМ) подтвердил наши предыдущие результаты (Грефнер и др., 2006; Громова и др., 2006). После нагрузки тонкой кишки раствором Рингера метка наблюдалась как в базальной, так и в апикальной частях клетки (рис 5, *a*). После нагрузки глюкозой при концентрации 50 мМ метка была сконцентрирована в апикальной части клетки, в области микроворсинок и терминальной сети, образовав сплошную полосу (рис. 5, *б*). После нагрузки галактозой при концентрации 50 мМ переносчик GLUT2 также располагался в

апикальной части клетки. Однако в этом случае переносчик располагался дискретно в виде отдельных глобул (рис. 5, *в*).

Распределение переносчиков гексоз в клетках Caco2. На рис. 6 *a, б* показано распределение переносчика SGLT1 в клетках Caco2 после всасывания 2.5 мМ глюкозы. SGLT1 был распределен как в апикальной, так и в базальной частях клеток Caco2 (рис. 6, *б*). На рис. 6, *a* показана субапикальная область клетки, отчетливо видно, что SGLT1, как и в энтероцитах, организован в глобулы, расположенные по периферии клетки.

В отсутствие нагрузки гексозами переносчик GLUT2 обнаруживается в апикальной и базальной частях клетки (рис. 6, *в*). Он формирует глобулы, которые локализованы вблизи базолатеральной мембраны (рис. 6, *в*). После нагрузки глюкозой или галактозой при концентрации

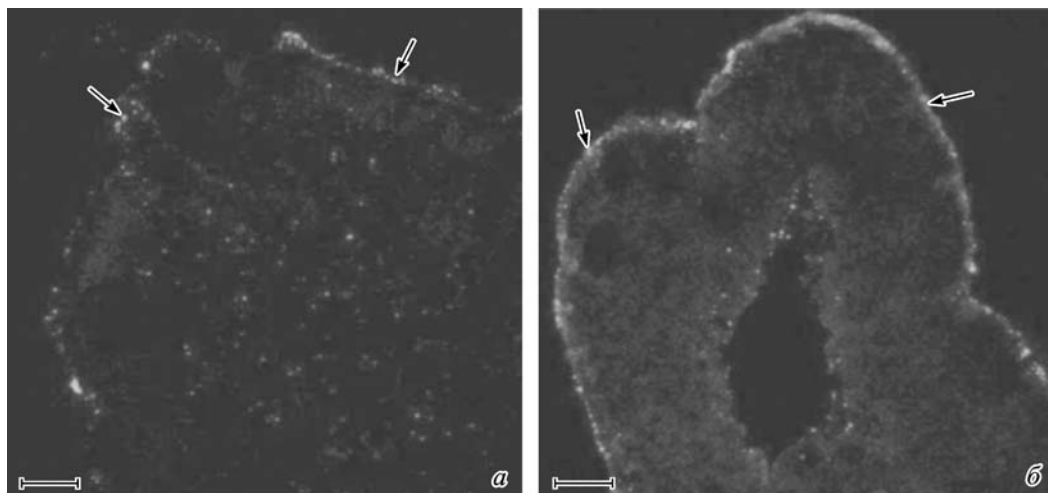


Рис. 4. Распределение переносчика SGLT1 в кишечной ворсинке. Конфокальная микроскопия.

*a* — распределение переносчика при нагрузке кишки раствором Рингера (контроль), метка локализуется в области микроворсинок в виде небольших глобул (стрелки); *б* — распределение переносчика при нагрузке кишки 50 мМ глюкозы, метка также локализуется в области микроворсинок, ее интенсивность выше, чем в контроле, поэтому метка сливается в сплошную линию (стрелки). Масштабные отрезки — 10 мкм.

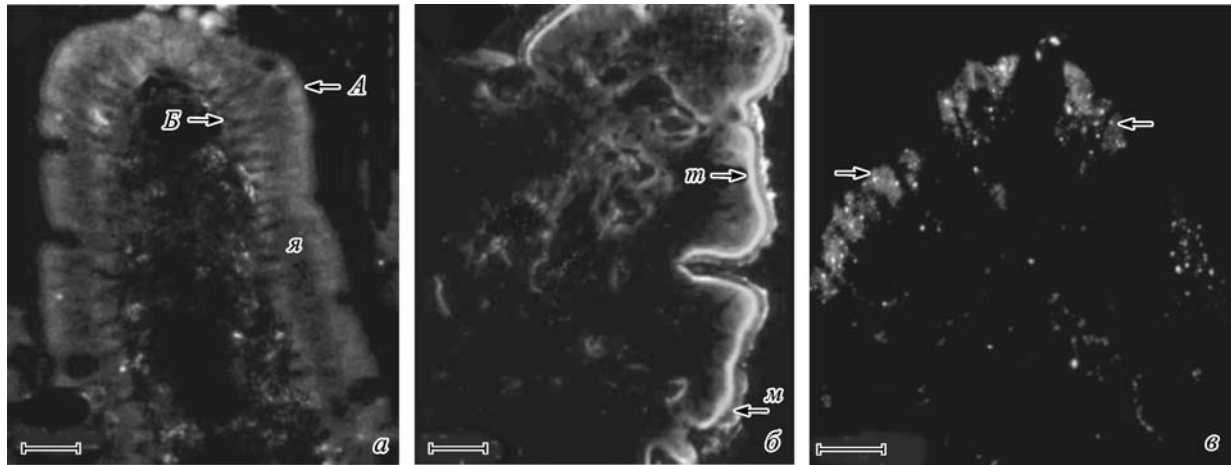


Рис. 5. Распределение переносчика GLUT2 в кишечной ворсинке. Конфокальная микроскопия.

*а* — распределение переносчика при нагрузке кишки раствором Рингера (контроль), метка присутствует как в апикальной (*А*), так и в базальной (*Б*) областях энтероцитов; *я* — ядра энтероцитов. *б* — распределение переносчика при нагрузке кишки 50 мМ глюкозы, метка концентрируется в апикальной части энтероцитов в области микроворсинок (*м*) и терминальной сети (*т*) и сливается в сплошную линию по краю кишечной ворсинки. *в* — распределение переносчика при нагрузке кишки 50 мМ галактозы, метка в виде глобул (*стрелки*) располагается преимущественно в апикальной части энтероцитов. Масштабные отрезки: *а* — 20, *б*, *в* — 10 мкм.

2.5 мМ переносчик преимущественно локализуется в базальной области клетки (рис. 6, *е—и*), а в апикальной отсутствует (рис. 6, *д*).

С помощью конфокального микроскопа оценено распределение актина в клетках Caco2. Актин локализован по границам клетки в области плотных контактов, а также на апикальной поверхности клеток в микроворсинках (рис. 6, *д*, *е*).

## Обсуждение

Полученные нами данные о распределении переносчиков гексоз в энтероцитах в основном совпадают с результатами работ других исследователей. Так, в ряде работ, проведенных с применением иммуноцитохимических методов, переносчик SGLT1 выявлен на щеточной кайме энтероцитов (Boshuizen et al., 2003; Khoursandi et al., 2004; Nabold et al., 2005), что полностью согласуется с представленными нами результатами. По-видимому, этот белок постоянно находится на апикальной мембране. Мы также показали, что метка к SGLT1 выявляется в виде небольших глобул. Этот факт является косвенным ответом на вопрос, сформулированный в обзоре Дроздовской и Томсона (Drozdowski, Thomson, 2006): «Локализован ли SGLT1 в специфические микродомены на щеточной кайме?».

Распределение переносчика GLUT2 в энтероцитах, его локализация в области апикальной мембраны клетки после нагрузки глюкозой при высоких концентрациях, а также его роль во всасывании глюкозы, подробно рассмотрены нами в предыдущих статьях (Грефнер и др., 2006; Громова и др., 2006) и согласуются с результатами, полученными в настоящей работе. Ранее (Грефнер и др., 2006) мы обсуждали возможные механизмы появления GLUT2 в области щеточной каймы. Везикулярный транспорт эндоцитозных пузырьков являлся одним из предлагаемых механизмов. Полученные в настоящей работе результаты косвенно подтверждают такую возможность. Дискретное глобулярное распределение флуоресцентных

меток к GLUT2 может говорить о его концентрировании в эндоцитозных пузырьках.

Анализ данных, полученных на электронном и конфокальном микроскопах, указывает на то, что клетки Caco2 в ходе культивирования образуют монослой, формируют щеточную кайму и соединительный комплекс, состоящий из плотного контакта и десмосом. Такая организация монослоя из клеток Caco2 сходна с организацией эпителиального слоя тонкой кишки, состоящего из энтероцитов. Это позволяет использовать культуру клеток Caco2 в качестве модели кишечного эпителия. Однако следует учитывать, что степень развития щеточной каймы и соединительных комплексов у разных клеток в монослое различается. Как отмечают некоторые авторы (Mahraoui et al., 1994), синтез мРНК переносчиков и соответственно их количество в клетке зависят от возраста культуры и степени морфологической и функциональной дифференциации клеток. Кроме того, даже структурно дифференцированные клетки могут обладать разной иммунореактивностью по отношению к белкам, связанным со щеточной каймой (Pinto et al., 1983). Возможно, это относится и к переносчикам, рассматриваемым в данной статье. Этот факт следует учитывать при интерпретации наблюдаемых картин распределения переносчиков SGLT1 и GLUT2 в клетках Caco2.

Литература, касающаяся распределения переносчиков в клетках Caco2, немногочисленна и противоречива. Большая часть работ посвящена изучению переносчиков глюкозы SGLT1. В работах (Kipp et al., 2003; Khoursandi et al., 2004) распределение этого белка в клетках Caco2 сравнивается с его распределением в энтероцитах. Согласно данным этих авторов, SGLT1 в клетках Caco2 присутствует не только на апикальной мембране, но и в цитоплазме клеток. Кроме того, выявлено перемещение SGLT1 по цитоплазме при инкубации клеток в растворе метилглюкозы ( $\alpha$ -methyl-D-glucose), являющейся субстратом SGLT1. Мы также обнаружили флуоресцентно меченный SGLT1 по всей толщине цитоплазмы, хотя более интенсивное окрашивание наблюдалось в апикальной и субапикальной частях клеток Caco2.

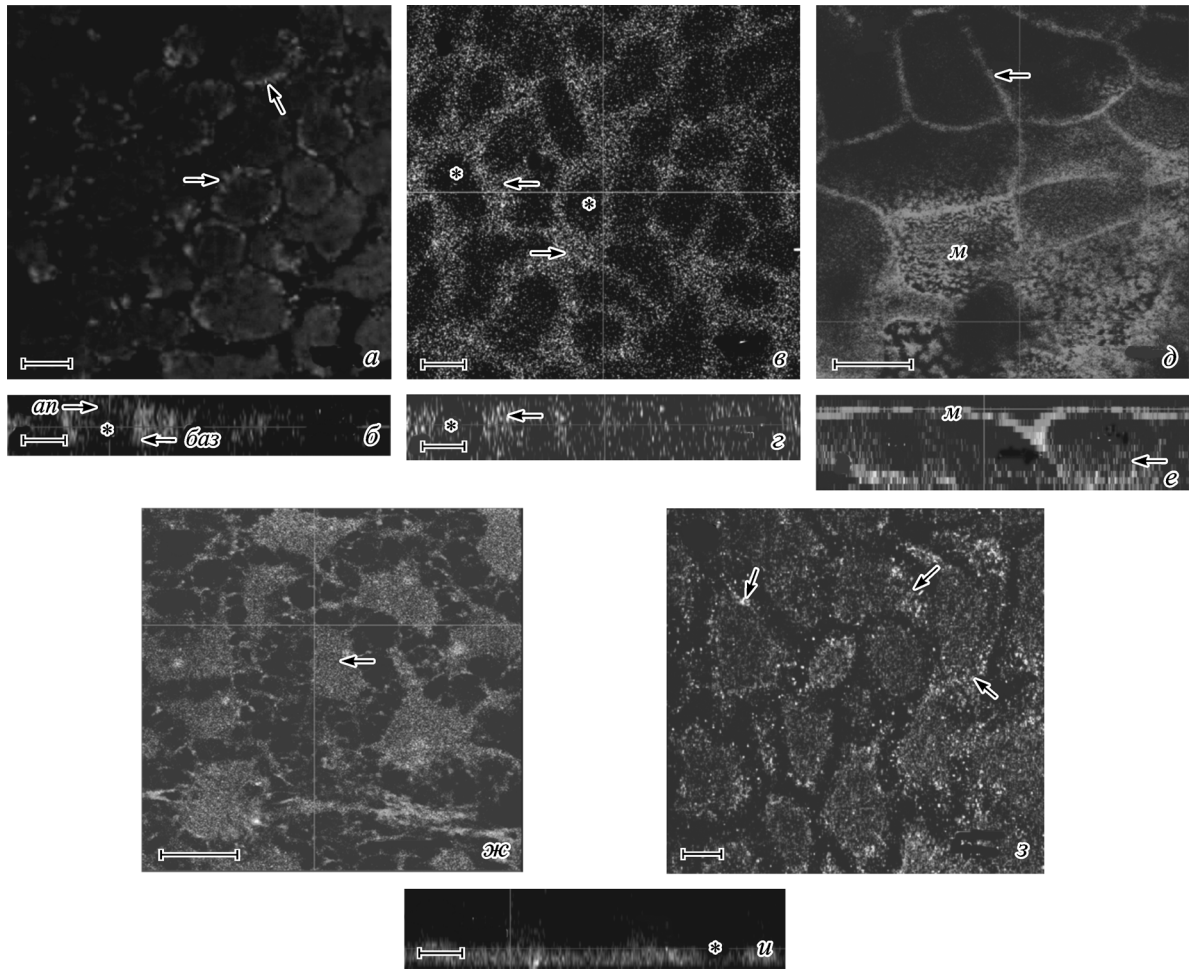


Рис. 6. Распределение переносчиков SGLT1 и GLUT2 в культуре клеток Caco2. Конфокальная микроскопия.

*a, б* — распределение переносчика SGLT1 после нагрузки 2.5 мМ глюкозы; *a* — горизонтальный оптический срез на субапикальном уровне клеток, метка в виде глобул располагается по периферии клеток (*стрелки*); *б* — вертикальный срез (в плоскости XZ) через монослой клеток, реконструированный из серии горизонтальных оптических срезов, метка на уровне апикальной (*ап*) и базальной (*баз*) цитоплазмы (*стрелки*); *звездочками* здесь и далее обозначены ядра клеток. *в, г* — распределение переносчика GLUT2 при отсутствии нагрузки (контроль); *в* — горизонтальный оптический срез культуры клеток на уровне ядер, *стрелками* указана метка к переносчику; *г* — вертикальный срез (в плоскости XZ) через монослой клеток, реконструированный из серии горизонтальных оптических срезов, метка — на уровне апикальной и базальной цитоплазмы (*стрелка*). *д–ж* — распределение GLUT2 после инкубации в растворе 2.5 мМ глюкозы; *д* — горизонтальный оптический срез на апикальном уровне клеток, метка к переносчику отсутствует, актин выявляется в микроворсинках (*м*) и плотных контактах (*стрелка*); *е* — вертикальный оптический срез (в плоскости XZ), реконструированный из серии горизонтальных оптических срезов, метка к переносчику выявляется в базальной цитоплазме (*стрелка*), актин — в микроворсинках (*м*) и клеточных границах; *ж* — горизонтальный оптический срез на базальном уровне клеток, метка к переносчику присутствует (*стрелка*). *з, и* — распределение переносчика GLUT2 после инкубации в растворе 2.5 мМ галактозы; *з* — горизонтальный оптический срез на базальном уровне клеток, метка к переносчику в виде глобул (*стрелки*); *и* — реконструкция вертикального оптического среза в плоскости XZ, переносчик выявляется в базальной цитоплазме. Масштабные отрезки — 10 мкм.

Те же авторы (Kipp et al., 2003; Khoursandiet al., 2004) приводят данные о том, что внутриклеточная фракция переносчика в клетках Caco2 локализована в эндосомах. Наши наблюдения, касающиеся глобулярной организации метки к SGLT1 в цитоплазме субапикальной области клеток Caco2, в принципе согласуются с этими результатами. Аналогичную картину мы наблюдали и в энтероцитах кишечника.

Локализация переносчика GLUT2 в клетках Caco2, как и в энтероцитах, зависит от наличия углеводной нагрузки. При всасывании клетками Caco2 растворов с низкой концентрацией гексоз переносчик сосредоточивается в базальной части клетки, где отвечает за выведение сахаров из клетки, что полностью согласуется с общепринятыми взглядами на роль GLUT2 в энтероцитах (Тимофеева и др., 2000; Ferraris, 2001; Kellett, Brot-Laroche, 2005; Drozdowski, Thomson, 2006).

В энтероцитах при некоторых видах углеводной нагрузки мы наблюдали дискретное, глобулярное свечение метки к переносчику GLUT2. В клетках Caco2 в сходных условиях выявлялись аналогичные картины свечения метки этого переносчика. Указанные факты наряду с данными литературы по транспорту других переносчиков глюкозы (Kipp et al., 2003; Khoursandiet al., 2004) позволяют считать, что перенос белка GLUT2 в область апикальной мембраны может осуществляться посредством везикулярного транспорта эндоцитозных пузырьков. К сожалению, не совсем ясно, по какой причине ни нам, ни другим исследователям до сих пор не удалось это показать на электронно-микроскопическом уровне.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 08-04-00675).



## Список литературы

- Грефнер Н. М., Громова Л. В., Груздков А. А., Снигиревская Е. С., Комиссарчик Я. Ю. 2006. Структурно-функциональный анализ роли облегченной диффузии в процессе всасывания глюкозы энтероцитами тонкой кишки крысы. Цитология. 48 (4) : 355—363.
- Громова Л. В., Грефнер Н. М., Груздков А. А., Комиссарчик Я. Ю. 2006. Оценка роли облегченной диффузии в транспорте глюкозы через апикальную мембрану энтероцита. Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. 92 (3) : 362—373.
- Громова Л. В., Груздков А. А. 1993. Относительная роль различных механизмов всасывания глюкозы в тонкой кишке при физиологических условиях. Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. 79 (6) : 65—72.
- Груздков А. А., Громова Л. В. 2001. Механизмы всасывания глюкозы в тонкой кишке крыс *in vivo* при высокой концентрации углеводов. Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. 87 (7) : 973—981.
- Комиссарчик Я. Ю., Снигиревская Е. С., Грефнер Н. М., Кевер Л. В., Груздков А. А., Громова Л. В. 2003. Структурно-функциональный анализ механизмов всасывания глюкозы при высоких концентрациях мальтозы в тонкой кишке крыс *in vivo*. Цитология. 45 (5) : 456—465.
- Миронов А. А., Комиссарчик Я. Ю., Миронов В. А. 1994. Методы электронной микроскопии в биологии и медицине. СПб., Наука. 400 с.
- Тимофеева Н. М., Иезутова Н. Н., Громова Л. В. 2000. Современные представления о всасывании моносахаридов, аминокислот и пептидов в тонкой кишке млекопитающих. Успехи физиол. наук. 31 (4) : 24—37.
- Уголев А. М., Зарипов Б. З. 1979. Методические приемы для изучения мембранного пищеварения и всасывания в тонкой кишке в условиях хронического эксперимента на крысах и некоторых других животных. Физиол. журн. СССР им. И. М. Сеченова. 65 (12) : 1849—1853.
- Blais A., Bissonnette P., Berteloot A. 1987. Common characteristics for Na<sup>+</sup>-dependent sugar transport in Caco2 cells and human fetal colon. J. Membr. Biol. 99 : 113—125.
- Boshuizen J. A., Reimerink J. H. J., Korteland-van Male A. M., van Ham V. J. J., Koopmans M. P. G., Büller H. A., Dekker J., Einerhandl A. W. C. 2003. Changes in small intestinal homeostasis, morphology, and gene expression during rotavirus infection of infant mice. J. Virol. 77 : 13 005—13 016.
- Cheeseman Ch. I. 2002. Intestinal hexose absorption: transcellular and/or paracellular fluxes. J. Physiol. 544 : 336—338.
- Dahlqvist A. 1964. Method for assay of intestinal disaccharidases. Anal. Biochem. 7 : 18—25.
- Drozdowski L. A., Thomson A. B. R. 2006. Intestinal sugar transport. World J. Gastroenterol. 12 : 1657—1670.
- Ferraris R. P. 2001. Dietary and developmental regulation of intestinal sugar transport. Biochem. J. 360 : 265—276.
- Gromova L. V., Grudkov A. A. 1999. Hydrolysis-dependent absorption of disaccharides in the rat small intestine (chronic experiments and mathematical modeling). Gen. Physiol. Biophys. 18 : 209—224.
- Habold C., Foltzer-Jourdainne C., Le Maho Y., Lignot J.-H., Oudart H. 2005. Intestinal gluconeogenesis and glucose transport according to body fuel availability in rats. J. Physiol. 566 (2) : 575—586.
- Helliwell P. A., Richardson M., Affeck J. A., Kellett G. L. 2000. Stimulation of fructose transport across the intestinal brush-border membrane by PMA is mediated by GLUT2 and dynamically regulated by protein kinase C. Biochem. J. 350 : 149—154.
- Kellett G. L. 2001. The facilitated component of intestinal glucose absorption. J. Physiol. 531 : 585—595.
- Kellett G. L., Brot-Laroche E. 2005. Apical GLUT2. A major pathway of intestinal sugar absorption. Diabetes. 54 : 3056—3062.
- Kellett G. L., Helliwell P. A. 2000. The diffusive component of intestinal glucose absorption is mediated by the glucose-induced recruitment of GLUT2 to brush-border membrane. Biochem. J. 380 : 155—162.
- Khoursandi S., Scharlau D., Herter P., Kuchnen C., Martin D., Kinne R. K. H., Kipp H. 2004. Different modes of sodium-D-glucose cotransporter-mediated D-glucose uptake regulation in Caco-2 cells. Amer. J. Physiol. Cell Physiol. 287 : C1041—C1047.
- Kipp H., Khoursandi S., Scharlau D., Kinne R. K. H. 2003. More than apical: distribution of SGLT1 in Caco-2 cells. Amer. J. Physiol. Cell Physiol. 285 : C737—C749.
- Lane J. S., Whang E. E., Rigberg D. A., Hines O. J., Kwan D., Zinner M. J., McFadden D. W., Diamond J., Ashley S. W. 1999. Paracellular glucose transport plays a minor role in the unanesthetized dog. Amer. J. Physiol. 276 : G789—G794.
- Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193 : 265—275.
- Madara J. L., Pappenheimer J. R. 1987. Structural basis for physiological regulation of paracellular pathways in intestinal epithelia. J. Membr. Biol. 100 : 149—164.
- Mahraoui L., Rodolose A., Barbat A., Dussaulx E., Zweibaum A., Rousset M., Brot-Laroche E. 1994. Presence and differential expression of SGLT1, GLUT1, GLUT2, GLUT3 and GLUT5 hexose-transporter mRNAs in Caco-2 cell clones in relation to cell growth and glucose consumption. Biochem. J. 298 : 629—633.
- Pappenheimer J. R. 2001. Role of pre-epithelial «unstirred» layers in absorption of nutrients from the human jejunum. J. Membr. Biol. 179 (2) : 185—204.
- Pappenheimer J. R., Reiss K. Z. 1987. Contribution of solvent drag through intercellular junctions to absorption of nutrients by the small intestine of the rat. J. Membr. Biol. 100 : 123—136.
- Pinto M., Robine-Leon S., Appay M.-D., Keding M., Triadou N., Dussaulx E., Lacroix B., Simon-Assmann P., Haffen K., Fogh J., Zweibaum A. 1983. Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. Biol. Cell. 47 : 323—330.
- Scott T. A., Melvin E. H. 1953. The determination of hexoses with anthrone. Anal. Biochem. 25 : 1656—1658.
- Ugolev A. M., Komissarchik Ya. Yu., Gromova L. V., Grudkov A. A., Snigirevskaya E. S., Brudnaya M. S. 1995. Structural and functional analysis of glucose absorption mechanisms in the rat small intestine *in vivo*. Gen. Physiol. Biophys. 14 : 405—417.

COMPARATIVE ANALYSIS OF SGLT1 AND GLUT2 TRANSPORTER DISTRIBUTION  
IN RAT SMALL INTESTINE ENTEROCYTES AND CACO2 CELLS DURING HEXOSE ABSORPTION*N. M. Grefner,<sup>1</sup> L. V. Gromova,<sup>2</sup> A. A. Gruzdkov,<sup>2</sup> Ya. Yu. Komissarchik<sup>1</sup>*<sup>1</sup> Institute of Cytology RAS and <sup>2</sup> Pavlov Institute of Physiology RAS, St. Petersburg;  
e-mail: grefner@mail.cytspb.rssi.ru

SGLT1 and GLUT2 hexose transporter distribution into enterocytes of small intestine isolated loop and Caco2 cell culture after absorption of high and low hexose concentrations has been considered. SGLT1 was found along intestine villus edge in isolated loop. After high concentration hexose load GLUT2 appeared to be situated in the apical parts of enterocytes. It is evident that GLUT2 participates in hexose transport across apical membrane. Cultured Caco2 cells form microvilli and cell junction complex typical for enterocyte. Glucose and galactose absorption by the cells from incubation medium has been observed. SGLT1 transporter is situated in the apical parts and around the nucleus of Caco2 cells and combined into globules. After low concentration hexose load, GLUT2 transporter is localized in the basal parts of Caco2 cells. Caco2 cell culture can be used as a model for studying of hexose transport in small intestine epithelium.

Key words: confocal and electron microscopy, enterocyte, Caco2, SGLT1, GLUT2, hexose.

---