

## ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ТРАНСПОРТЕРОВ ГЛЮКОЗЫ SGLT1 И GLUT2 И ЦИТОСКЕЛЕТА В ЭНТЕРОЦИТАХ И КЛЕТКАХ Caco2 ПРИ ТРАНСПОРТЕ САХАРОВ

© Н. М. Грефнер,<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: [ngrefner@yandex.ru](mailto:ngrefner@yandex.ru)

В статье рассматривается распределение элементов цитоскелета (микротрубочек и актиновых филаментов) и транспортеров глюкозы SGLT1 и GLUT2 в энтероцитах тонкой кишки крысы и клетках Caco2 при всасывании сахаров. С помощью конфокального микроскопа установлено изменение распределения транспортеров SGLT1 и GLUT2 во всасывающих клетках кишечной ворсинки в зависимости от нагрузки мальтозой. Показана колокализация этих транспортеров с актином. На ультраструктурном уровне обнаружено увеличение числа окаймленных пузырьков вблизи микротрубочек в апикальной части клеток при всасывании больших концентраций сахаров. Этот факт наряду с выявленной колокализацией транспортеров глюкозы и актина, а также колокализация актина и тубулина могут свидетельствовать об участии этих элементов цитоскелета в перемещении транспортеров глюкозы к плазматической мембране исследованных клеток.

Ключевые слова: энтероциты, клетки Caco2, цитоскелет, микротрубочки, актин, транспортеры SGLT1 и GLUT2, всасывание глюкозы.

В энтероцитах, как и в других эпителиальных клетках, важным элементом цитоскелета являются микротрубочки. В эпителиальных клетках можно выделить радиально расположенные центросомальные микротрубочки, участвующие в формировании веретена деления клетки, и сеть нецентросомальных микротрубочек. Последние отвечают за поддержание формы клетки, клеточную поляризацию, везикулярный транспорт и позиционирование клеточных органелл, например аппарата Гольджи (Bloom, Goldstein, 1998; Musch, 2004; Suzaki et al., 2004; Canania et al., 2006; Halbleib et al., 2007; Weisz, Rodriguez-Boulan, 2009).

Большинство нецентросомальных микротрубочек ориентировано вдоль базально-апикальной оси клетки, причем их минус-концы направлены к апикальной области клеток, а плюс-концы — к базальной (Bloom, Goldstein, 1998; Musch, 2004; Canania et al., 2006). Поляризация эпителиальных клеток сопровождается преимущественным выстраиванием микротрубочек вдоль базально-апикальной оси, причем оба процесса регулируются, по-видимому, одними и теми же сигнальными путями (Musch, 2004; Rodriguez-Boulan et al., 2005; Halbleib et al., 2007; Weisz, Rodriguez-Boulan, 2009; Jaulin, Kreitzer, 2010). Транспорт белков щеточной каймы из базальной в апикальную область клетки в ходе ее поляризации также ассоциирован с реорганизацией и стабилизацией микротрубочек (Jaulin, Kreitzer, 2010).

Наряду с вертикально расположенными микротрубочками одинаковой полярности имеется сеть горизонтальных микротрубочек различной полярности, которые подстилают клеточную поверхность, и сеть микротрубочек в основании клетки. Они обнаружены у клеточных

линий, происходящих из призматического эпителия, например MDCK и Caco2 (Waschke, Drenckhahn, 2000; Musch, 2004; Halbleib et al., 2007).

Часть микротрубочек (преимущественно в надъядерной области цитоплазмы) расположена радиально и тянется от аппарата Гольджи к апикальной мембране (Suzaki et al., 2004). Им отводится роль поддержания формы и места аппарата Гольджи в надъядерной цитоплазме.

Микротрубочки обеспечивают везикулярный транспорт белков. Прежде всего — это базально-апикально ориентированные микротрубочки. Экзоцитозные пузырьки, ассоциированные с минус-концом микротрубочек, движутся по направлению к апикальной мембране, а эндоцитозные пузырьки, ассоциированные с плюс-концом, — к базолатеральной мембране. Горизонтально расположенные микротрубочки также участвуют в везикулярном транспорте и базолатеральном экзоцитозе вблизи плотных контактов (Musch, 2004; Weisz, Rodriguez-Boulan, 2009).

Микротрубочки как один из элементов цитоскелета участвуют в осуществлении барьерной функции эпителиального пласта за счет структурных изменений межклеточных контактов. В частности, на культуре клеток Caco2 показали, что нарушение фосфорилирования тубулина ведет к изменению структуры микротрубочек и проницаемости монослоя (Banan et al., 2004).

Ранее нами (Грефнер и др., 2006, 2010, 2012; Громова и др., 2006) и другими авторами (см. обзор: Kellert et al., 2008; Chaudhry et al., 2012) было показано, что всасывание сахаров из просвета кишечника может сопровождаться перераспределением транспортеров глюкозы SGLT1 и GLUT2 в энтероцитах, расположенных в разных частях

кишечной ворсинки. Появление транспортеров в различных областях клетки может происходить как за счет синтеза белков *de novo* (Gouyon et al., 2003), так и за счет перемещения уже имеющихся транспортеров внутри клетки (Khoursandi et al., 2004; Nabold et al., 2005; Suzuki et al., 2006). Можно предположить, что эти процессы коррелируют с реорганизацией и перераспределением микротрубочек.

В настоящей работе мы рассматриваем локализацию микротрубочек и транспортеров глюкозы SGLT1 и GLUT2 в энтероцитах тонкой кишки крысы и клетках линии Caco2, являющихся их моделями, при нагрузке сахарами в разных концентрациях.

### Материал и методика

В экспериментах *in vivo* использовали самцов белых крыс линии Вистар (масса тела 180—200 г). Нагрузки мальтозой осуществляли путем перфузии изолированной петли тонкой кишки в условиях хронического эксперимента (Уголев, Зарипов, 1979). Изолированную петлю перфузировали в течение 1 ч раствором Рингера (pH 7.1—7.4) или растворами мальтозы (12.5 и 50 мМ), приготовленными на растворе Рингера, после чего крыс умерщвляли. Для электронно-микроскопических исследований участки изолированной петли фиксировали в 2%-ном растворе глutarальдегида на фосфатном буфере (PBS), постфиксировали в 1%-ном растворе OsO<sub>4</sub> на том же буфере, обезвоживали в этиловом спирте возрастающих концентраций до абсолютного спирта и заливали в смесь Эпона и Аралдита (Миронов, Комиссарчик, 1994). Из полимеризованных блоков на ультрамикротоме LKB-III получали ультратонкие срезы, контрастировали их последовательно по 10 мин в цитрате свинца, уранил-ацетате и вновь в цитрате свинца. Ультратонкие срезы изучали под электронным микроскопом Libra 120 (Carl Zeiss, Германия).

Для исследования образцов в конфокальном микроскопе участки изолированной петли тонкой кишки фиксировали в 2%-ном формальдегиде на PBS 1 ч, пропитывали 30%-ным раствором сахарозы, которая служила криопротектором, и замораживали в изооктане, охлажденном жидким азотом. Образцы сохраняли при -30 °С. Срезы толщиной 7—10 мкм получали на замораживающем микротоме Leica. Переносчики сахаров выявляли на срезах с помощью непрямого иммуномечения. Срезы пермеабилizировали 0.3%-ным Triton X-100 на PBS в течение 20 мин. Неспецифическое связывание иммуноглобулинов блокировали 3%-ным BSA на 0.3%-ном Triton X-100/PBS в течение 1 ч. В качестве первых антител использовали поликлональные козы антитела к SGLT1, кроличьи антитела к GLUT2 в разведении 1 : 500 и кроличьи антитела к  $\alpha$ -тубулину в разведении 1 : 250 на 0.5%-ном BSA/0.3%-ном Triton X-100/PBS (все антитела производства Santa Cruz Biotechnology Inc., США). В первых антителах срезы инкубировали в течение ночи при 4 °С, после чего для избавления от избытка антител срезы промывали 4 раза по 10 мин в растворе 0.5%-ного BSA/0.3%-ного Triton X-100/PBS. Для визуализации SGLT1 в качестве вторых антител использовали ослиные антитела против иммуноглобулинов козы, конъюгированные с Alexa-633 (Molecular Probes Inc., США), для GLUT2 и  $\alpha$ -тубулина — куриные антитела против иммуноглобулинов кролика, конъюгированные с Alexa-488

(Molecular Probes Inc., США). Вторые антитела разводили в концентрации 1 : 500 на 0.5%-ного BSA/0.3 % Triton X-100/PBS и окрашивали ими срезы в течение 2 ч при комнатной температуре. После этого срезы промывали 2 раза по 30 мин в растворе PBS.

Для визуализации фибриллярного актина срезы окрашивали родамин-фаллоидином (Molecular Probes Inc., США) в разведении 1 : 100 на PBS в течение 30 мин, а затем промывали PBS 4 раза по 10 мин.

По окончании окрашивания срезы помещали в среду DABCO на предметное стекло. Готовые препараты анализировали с помощью конфокального микроскопа Leica TCS SL (Leica, Германия).

Клетки Caco2 для экспериментов *in vitro* были получены из Российской коллекции культур клеток позвоночных Института цитологии РАН. Клетки были посеяны на покровные стекла в чашках Петри и на полиэфирные мембранные фильтры (диаметр пор 0.4 мкм) в планшетах. Культуру клеток выращивали в среде DMEM с добавлением бычьей эмбриональной сыворотки в концентрации 10 %, среду меняли на свежую 1 раз в 2 сут. Чашки Петри и планшеты помещали в инкубатор, в котором поддерживали температуру 37 °С в атмосфере 5 % CO<sub>2</sub>.

На 21-е сут развития клетки использовали для эксперимента. Инкубационная среда для эксперимента 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 глутамина, 2.5 или 25 глюкозы. Перед опытом монослой клеток промывали дважды в 1 мл среды без субстрата и 1 раз в 1 мл среды с субстратом, а затем инкубировали с 1 мл среды с субстратом при 37 °С. Через 60 мин инкубационную среду полностью удаляли и клетки фиксировали.

Для иммуноцитохимического исследования клетки на стеклах фиксировали 2%-ным раствором формальдегида на PBS в течение 10 мин. Иммуномечение  $\alpha$ -тубулина в клетках проводили так же, как на срезах кишечника. Препараты анализировали в конфокальном микроскопе Leica TCS SL.

Для электронно-микроскопических исследований использовали культуру клеток на фильтрах. Клетки фиксировали 2%-ным раствором глutarальдегида 30 мин, постфиксировали 1%-ным раствором OsO<sub>4</sub> 30 мин, обезвоживали и вместе с фильтрами заключали в смесь Эпона и Аралдита, как это описано для фрагментов кишки. Далее из блоков с образцами изготавливали ультратонкие срезы, которые контрастировали уранил-ацетатом и цитратом свинца по 10 мин. Изучение ультратонких срезов проводили в электронном микроскопе, как описано выше.

Использованные реактивы. В работе использовали глюкозу, глутамин, мальтозу, сахарозу, соли CaCl<sub>2</sub>, KCl, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub> и NaCl (Реахим); PBS, среду DMEM и бычью эмбриональную сыворотку (Биолот); OsO<sub>4</sub> (Московский завод им. Войкова); глutarальдегид (Ted Pella, Inc.); параформальдегид (ТААБ); BSA и HEPES (Sigma); Эпон 812, Аралдит М и DABCO (Fluca); уранил-ацетат (Merck); цитрат свинца (Serva); Triton X-100 (Ferac Berlin); поликлональные козы антитела к SGLT1, кроличьи антитела к GLUT2 и кроличьи антитела к  $\alpha$ -тубулину (Santa Cruz Biotechnology Inc.); ослиные антитела против иммуноглобулинов козы, конъюгированные с Alexa-633, куриные антитела против иммуноглобулинов кролика, конъюгированные с Alexa-488, и родамин-фаллоидин (Molecular Probes Inc.).

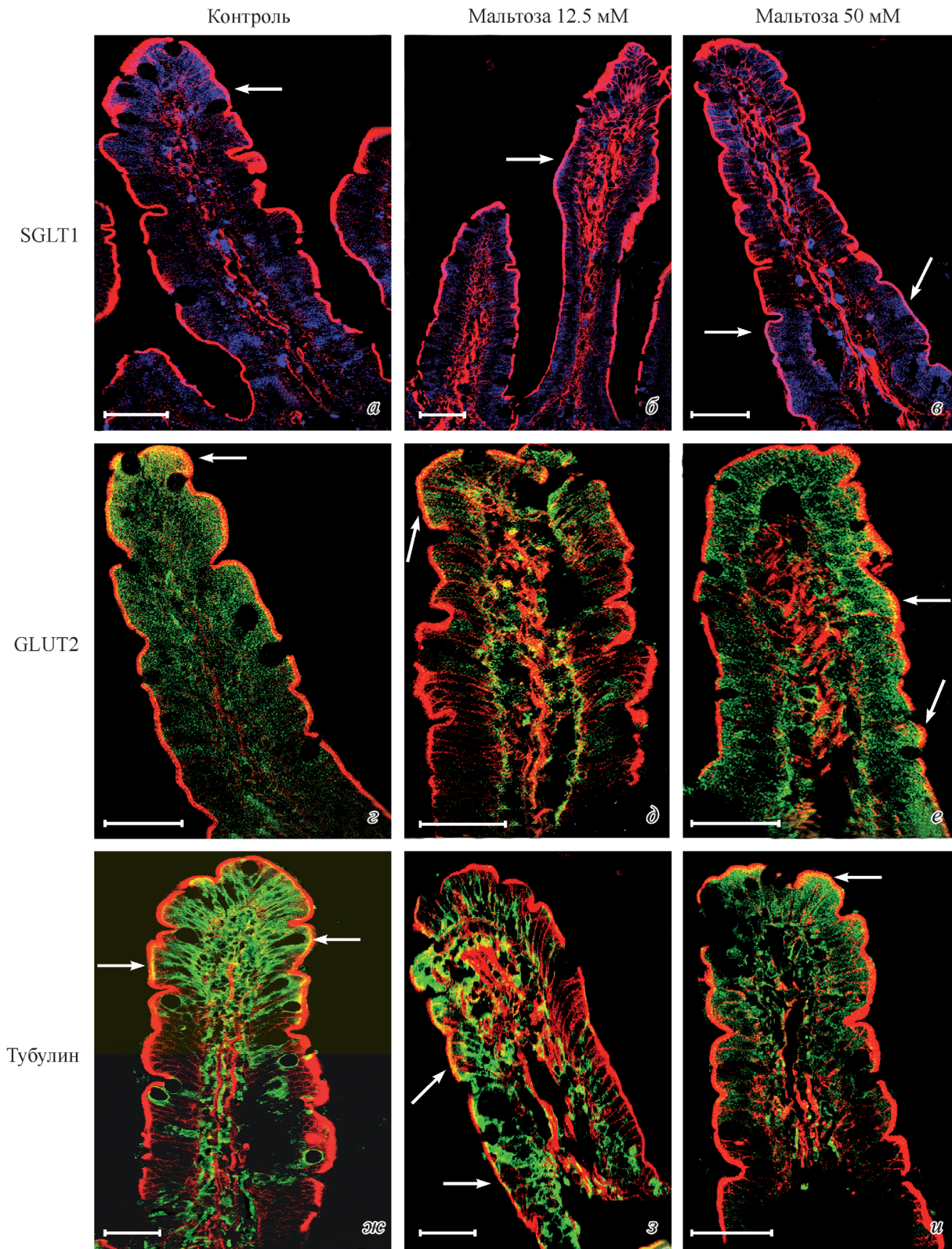


Рис. 1. Распределение транспортеров глюкозы SGLT1 и GLUT2,  $\alpha$ -тубулина и фибриллярного актина в кишечной ворсинке. Конфокальная микроскопия.

*a—b* — распределение SGLT1 при нагрузке кишки растворами мальтозы различной концентрации; красная флуоресценция (здесь и далее) — фибриллярный актин, синяя флуоресценция — транспортер SGLT1, колокализация метки к актину и транспортеру дает фиолетовую окраску (участки колокализации отмечены стрелками). *г—e* — распределение GLUT2 при нагрузке растворами мальтозы различной концентрации; зеленая флуоресценция — транспортер GLUT2, колокализация метки к актину и транспортеру дает желтую окраску (стрелки). *ж—и* — распределение  $\alpha$ -тубулина при нагрузке растворами мальтозы; зеленая флуоресценция —  $\alpha$ -тубулин, колокализация метки к актину и тубулину дает желтую окраску (стрелки). Масштабные отрезки — 47 мкм.

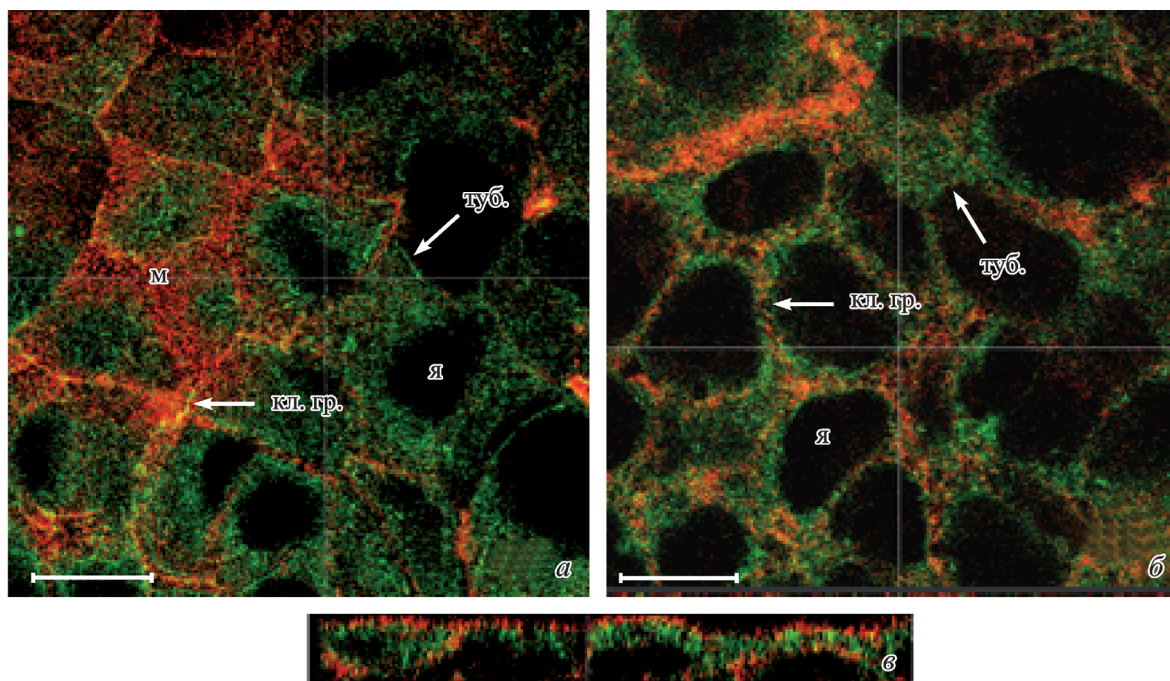


Рис. 2. Распределение  $\alpha$ -тубулина и фибриллярного актина в клетках культуры Caco2 после инкубирования в растворе 2.5 мМ глюкозы.

*a* — горизонтальный оптический срез на апикальном уровне клеток; *b* — горизонтальный оптический срез на базальном уровне клеток; *в* — вертикальный срез (в плоскости XZ) через монослой клеток, реконструированный из серии горизонтальных оптических срезов. Красная флуоресценция — актин, зеленая флуоресценция —  $\alpha$ -тубулин, колокализация областей мечения актина и тубулина дает желтую окраску. *м* — микроворсинки, кл. гр. — границы клеток, туб. — области мечения тубулина, я — ядро. Масштабные отрезки — 15 мкм.

## Результаты

**Распределение фибриллярного актина.** Как было показано в предыдущих работах (Грефнер и др., 2010, 2012), фибриллярный актин в энтероцитах и клетках Caco2 выявляется вдоль клеточных границ и в микроворсинках. На изображениях, полученных с помощью конфокального микроскопа (рис. 1), видно, что актин образует кайму в области микроворсинок по периметру кишечной ворсинки. Такое же распределение фибриллярного актина выявляется в клетках Caco2 (рис. 2). Аналогичное распределение актина наблюдается и на ультраструктурном уровне (рис. 3, 4).

**Распределение транспортеров глюкозы SGLT1 и GLUT2 в энтероцитах.** С помощью конфокальной микроскопии было изучено распределение транспортеров глюкозы SGLT1 и GLUT2 в энтероцитах крыс при нагрузке тонкой кишки мальтозой в различных концентрациях. На рис. 1, *a–в* можно видеть, что метка к SGLT1 преобладает в апикальной части энтероцитов, а в области щеточной каймы она колокализована с меткой к актину щеточной каймы. При нагрузке кишки раствором Рингера (контроль) и раствором мальтозы 12.5 мМ (низкая концентрация) участки колокализации находятся преимущественно в верхней половине кишечной ворсинки. При нагрузке раствором мальтозы 50 мМ (высокая кон-

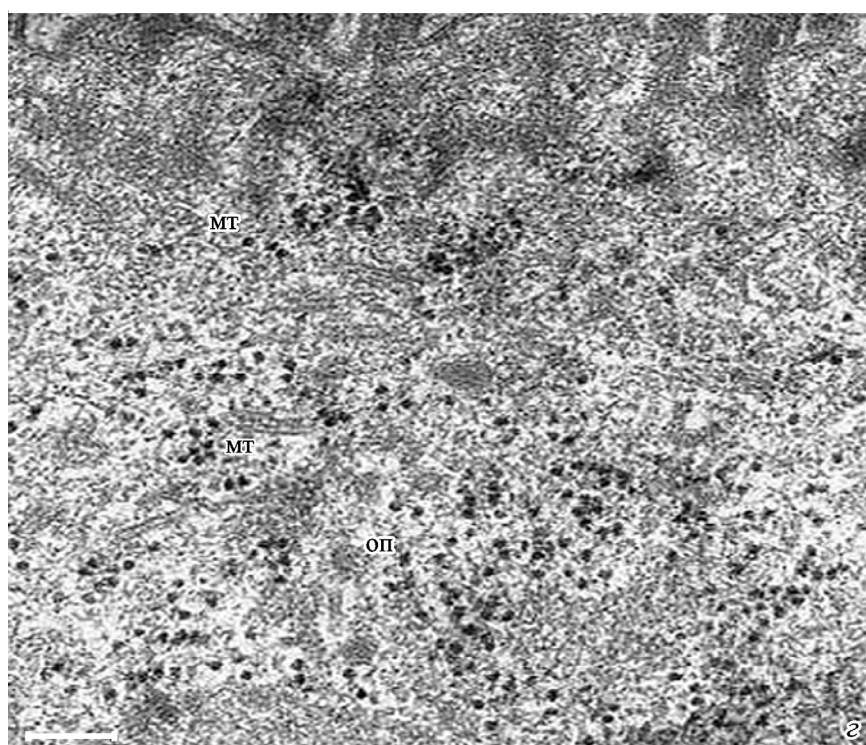
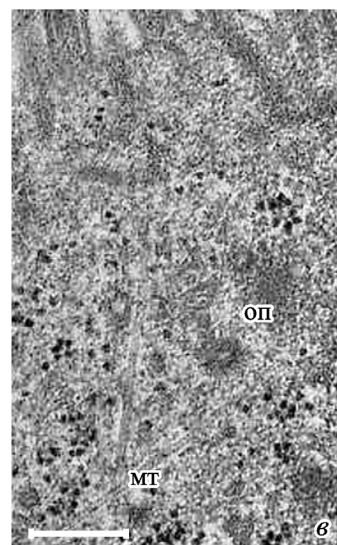
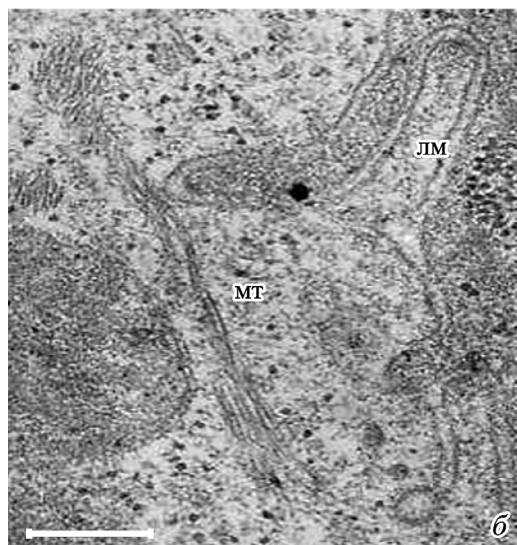
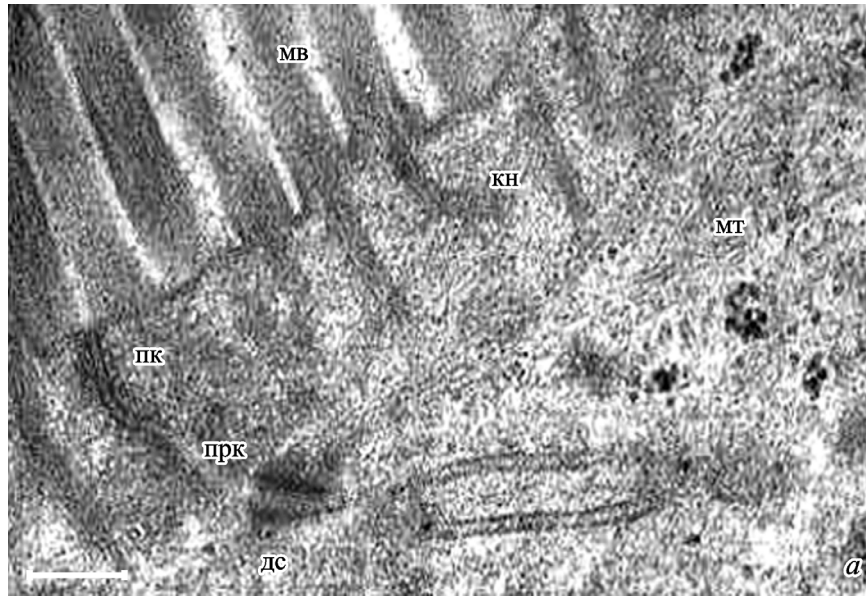
центрация) такие участки встречаются уже в нижней половине ворсинки.

Транспортер GLUT2 (рис. 1, *з–е*) в контроле и при нагрузке мальтозой в низкой концентрации обнаруживается как в базальной, так и в апикальной частях клетки и колокализован с актином в верхней половине кишечной ворсинки. При перфузии раствором мальтозы в концентрации 50 мМ метка к GLUT2 более интенсивна в апикальной части энтероцитов, и участки ее колокализации с меткой к актину расположены по всей длине кишечной ворсинки.

**Распределение  $\alpha$ -тубулина в энтероцитах.** Распределение  $\alpha$ -тубулина во всасывающих клетках кишечной ворсинки при нагрузке мальтозой анализировали также на конфокальном микроскопе (рис. 1, *ж–и*). Метку к  $\alpha$ -тубулину можно обнаружить как в апикальной части клетки, так и вблизи базолатеральной мембраны. Сравнивая локализацию  $\alpha$ -тубулина в разных частях кишечной ворсинки при различных нагрузках, можно заметить, что в контроле (при перфузии кишки раствором Рингера) метка к  $\alpha$ -тубулину преобладает в верхней половине кишечной ворсинки. На участках энтероцитов, прилегающих к щеточной кайме, метка к  $\alpha$ -тубулину колокализована с актином. При перфузии тонкой кишки раствором мальтозы в концентрации 12.5 мМ метка к  $\alpha$ -тубулину присутствует в энтероцитах

Рис. 3. Ультраструктура энтероцитов при нагрузке раствором Рингера (контроль) (*a, б*) и раствором 50 мМ мальтозы (*в, г*).

*a* — апикальная область энтероцитов, микротрубочки ориентированы параллельно апикальной мембране; *б* — микротрубочки вблизи латеральной мембраны; *в* — микротрубочки ориентированы вдоль базально-апикальной оси клетки, в апикальной части энтероцита вблизи микротрубочек многочисленные окаймленные пузырьки; *г* — микротрубочки и окаймленные пузырьки в апикальной области клетки. дс — десмосома, кн — корневые нити, лм — латеральная мембрана, мв — микроворсинки, мт — микротрубочки, оп — окаймленные пузырьки, пк — плотный контакт, прк — промежуточный контакт. Масштабные отрезки — 1 мкм.



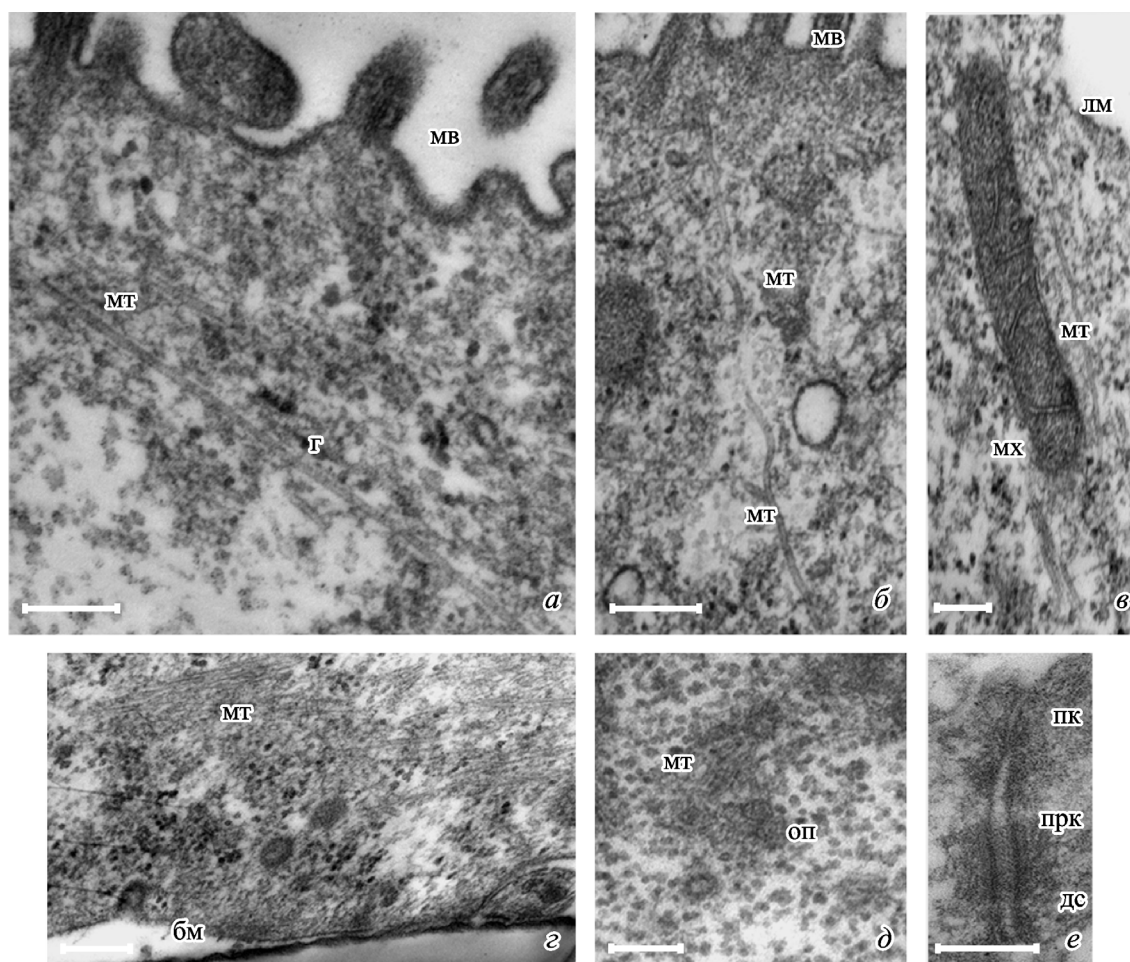


Рис. 4. Ультраструктура клеток Caco2.

*a* — микротрубочки, параллельные апикальной мембране; *б* — микротрубочки в апикальной части клетки, ориентированные вдоль апикально-базальной оси; *в* — микротрубочки, параллельные латеральной мембране; *г* — микротрубочки вблизи базальной мембраны; *д* — окаймленные пузырьки вблизи микротрубочек; *е* — соединительный комплекс. бм — базальная мембрана, дс — десмосома, лм — латеральная мембрана, мв — микроворсинки, мт — микротрубочки, мх — митохондрии, оп — окаймленные пузырьки, пк — плотный контакт, прк — промежуточный контакт. Масштабные отрезки — 2 (*a–д*) и 0.2 (*е*) мкм.

по всей длине ворсинки и на всем ее протяжении колокализована с актином. При нагрузке мальтозой в концентрации 50 мМ метка к  $\alpha$ -тубулину преобладает на вершине ворсинки.

Распределение  $\alpha$ -тубулина в клетках Caco2. Распределение  $\alpha$ -тубулина в культуре клеток Caco2 не зависит от ее нагрузки (в контроле и при инкубировании в растворах 2.5 и 25 мМ глюкозы). На рис. 2 показано распределение метки к  $\alpha$ -тубулину после инкубирования культуры в растворе 2.5 мМ глюкозы.  $\alpha$ -Тубулин встречается как в апикальной, так и в базальной частях клетки, однако в апикальной и субапикальной цитоплазме его значительно больше. Вблизи клеточных границ в апикальной части клетки  $\alpha$ -тубулин колокализован с актином, в базальной части клетки такой колокализации не обнаружено.

Ультраструктура энтероцитов. Ультраструктура энтероцитов в контроле и при разных вариантах нагрузки весьма сходна. На апикальной поверхности видны многочисленные микроворсинки, корневые нити которых погружены в апикальную цитоплазму (рис. 3, *a*). На этой же фотографии видно, что между энтероцитами формируется соединительный комплекс, состоящий из плотного контакта, промежуточного контакта и десмосомы.

В цитоплазме энтероцитов находится множество микротрубочек. Часть из них ориентирована параллельно апикальной мембране и расположена вблизи корневых нитей микроворсинок (рис. 3, *a*). Промежуточные фибриллы, параллельные апикальной мембране, в области соединительного комплекса примыкают к десмосоме (рис. 3, *a*). В цитоплазме присутствуют микротрубочки, ориентированные вдоль апикально-базальной оси клетки (рис. 3, *б*), а также микротрубочки, перпендикулярные ей (рис. 3, *г*).

При нагрузке сахарами в цитоплазме энтероцитов появляются многочисленные окаймленные пузырьки, которые соседствуют с микротрубочками (рис. 3, *г*, *д*). Чаше всего их можно обнаружить в апикальной части клеток.

Ультраструктура клеток Caco2. Как было показано ранее (Грефнер и др., 2012), клетки Caco2 на 21-е сут культивирования приобретают признаки, характерные для энтероцитов. На рис. 4 показаны клетки Caco2 из монослоя, выращенного на полиэфирных мембранных фильтрах. На апикальной поверхности клеток формируются микроворсинки (рис. 4, *a*, *б*), а между латеральными мембранами клеток — соединительный комплекс (рис. 4, *е*). Как и в энтероцитах, в клетках Caco2 встречаются микротрубочки, расположенные параллель-

но апикальной мембране (рис. 4, а), вдоль базально-апикальной оси клетки (рис. 4, б), параллельно латеральной мембране (рис. 4, в). Кроме того, в культивируемых клетках множество микротрубочек располагается параллельно базальной мембране (рис. 4, з). В клетках, которые были инкубированы в растворе глюкозы 25 мМ, встречаются окаймленные пузырьки, соседствующие с микротрубочками (рис. 4, д).

### Обсуждение

Неоднократно как нами (Грефнер и др., 2006, 2010, 2012; Громова и др., 2006), так и другими авторами (Khoirsandi et al., 2004; Hahold et al., 2005; Zheng, Sarr, 2012) было показано, что в кишечном эпителии или в монослоях клеток Caco2 — моделях кишечного эпителия — при всасывании глюкозы из растворов с высокой концентрацией транспортер GLUT2 обнаруживается не только в базальной, но и в апикальной части клетки, в области щеточной каймы. Полученные нами новые данные свидетельствуют о том, что при всасывании сахаров в низких концентрациях и даже в контроле транспортер GLUT2 может присутствовать в апикальной части энтероцитов и колокализован с актином щеточной каймы, но только в верхней половине кишечной ворсинки. При увеличении концентрации сахаров в процесс всасывания включаются нижние отделы кишечной ворсинки: транспортеры — как SGLT1, так и GLUT2 — выявляются в энтероцитах нижней половины кишечной ворсинки и часто колокализованы с актином щеточной каймы. Однако до сих пор остается неясным, как они там появляются: перемещаются из одной части клетки в другую или вновь синтезируются и поставляются в нужное место. В обоих случаях должны быть задействованы какие-то структурные элементы, с помощью которых происходит перенос транспортеров в клетку. Можно предположить, что транспортеры переносятся эндосомами, ассоциированными с микротрубочками. Действительно, в настоящей работе мы показали корреляцию между перераспределением транспортеров сахаров и изменениями цитоскелета в энтероцитах и клетках Caco2. Из приведенных результатов видно, что при нагрузке мальтозой происходит перераспределение  $\alpha$ -тубулина, аналогичное таковому для транспортеров глюкозы, т. е. при всасывании сахаров он в большем количестве выявляется в нижних отделах ворсинки. По-видимому, эти процессы взаимосвязаны. В отличие от энтероцитов в клетках Caco2 перераспределение  $\alpha$ -тубулина нам наблюдать не удалось. Тем не менее иммунопомеченный  $\alpha$ -тубулин оказывается более интенсивным в апикальной части клеток, где присутствуют многочисленные окаймленные пузырьки, которые могут содержать транспортеры глюкозы. Этот факт может указывать на то, что микротрубочки участвуют в транспорте SGLT1 и GLUT2.

Наши данные согласуются с результатами, полученными другими исследователями. Для SGLT1 показано, что этот транспортер действительно включен в эндосомы, связанные с микротрубочками (Wright et al., 1997; Kirp et al., 2003; Khoirsandi et al., 2004). Отмечено также, что при деполимеризации микротрубочек нарушается транспорт SGLT1 (Suzuki et al., 2006). О связи транспортера и микротрубочек свидетельствуют также снижение количества SGLT1 на щеточной кайме и подавление всасывания глюкозы при деполимеризации микротрубочек, в то время как общая экспрессия SGLT1 в клетке остается

неизменной (Canania et al., 2006). Для GLUT2 показаны его колокализация с ранними эндосомами (Ait-Omar et al., 2011), а также снижение активности GLUT2 при воздействии нокодазола и цитохалазина — препаратов, разрушающих микротрубочки (Zheng, Sarr, 2012). В мышечных клетках описаны эндосомы и везикулы, содержащие транспортер GLUT4, и предполагается, что подобные везикулы могут присутствовать в других тканях и содержать другие транспортеры глюкозы. Эти везикулы связаны с микротрубочками, которые обеспечивают доставку GLUT4 к апикальной мембране (Vogan, 2012). Кроме того, показано, что не только транспортеры глюкозы, но и аквапорины заключены в специфические гранулы, и их перемещение к апикальной мембране сопровождается реорганизацией микротрубочек (Горшков, Комиссарчик, 1999).

На изображениях, полученных с помощью конфокального микроскопа, можно видеть, что в энтероцитах и клетках Caco2 иммунопомеченный к тубулину часто колокализован с актином в области щеточной каймы и соединительного комплекса. На электронно-микроскопических фотографиях микротрубочки многочисленны в апикальной области энтероцитов и клеток Caco2, вблизи корневых нитей. В литературе существует множество примеров кооперации актинового цитоскелета и микротрубочек в организации везикулярного транспорта (см. обзоры: Musch, 2004; Weisz, Rodriguez-Boulan, 2009). Актиновые нити выступают в качестве направляющих при перемещении везикул в клетке (Robertson et al., 2009). По-видимому, оба компонента цитоскелета — микротрубочки и актиновые филаменты — участвуют в транспорте SGLT1 и GLUT2 внутри энтероцитов.

### Список литературы

Горшков А. Н., Комиссарчик Я. Ю. 1999. Электронно-микроскопическое и иммуноцитохимическое исследование реорганизации системы микротрубочек в гранулярных клетках мочевого пузыря лягушки при индукции водного транспорта. Цитология. 41 (1) : 40—47. (Gorshkov A. N., Komissarchik Ya. Yu. 1999. Electron-microscopical, immunocytochemical and fluorescent-microscopical study of reorganization of the microtubule system in granular cells of frog urinary bladder after water transport induction. Tsitologiya. 41 (1) : 40—47.)

Грефнер Н. М., Громова Л. В., Груздков А. А., Комиссарчик Я. Ю. 2010. Сравнительный анализ распределения переносчиков SGLT1 и GLUT2 в энтероцитах тонкой кишки крысы и клетках Caco2 при всасывании гексоз. Цитология. 52 (7) : 580—587. (Grefner N. M., Gromova L. V., Gruzdkov A. A., Komissarchik Ya. Yu. 2010. Comparative analysis of SGLT1 and GLUT2 transporters distribution in rat small intestine enterocytes and Caco2 cells during hexose absorption. Cell and Tissue Biol. 4 (4) : 354—361.)

Грефнер Н. М., Громова Л. В., Груздков А. А., Комиссарчик Я. Ю. 2012. Культура клеток Caco2 как модель кишечного эпителия для изучения транспорта гексоз. Цитология. 54 (4) : 318—323. (Grefner N. M., Gromova L. V., Gruzdkov A. A., Komissarchik Ya. Yu. 2012. Caco2 cell culture as an intestinal epithelium model to study hexose transport. Cell Tissue Biol. 6 (4) : 335—340.)

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. (Grefner N. M., Gromova L. V., Gruzdkov A. A., Snigirevskaya E. S., Komissarchik Ya. Yu. 2006. Structural-functional analysis of the role played by facilitated dif-

fusion in the process of glucose absorption by rat small intestine enterocytes. *Tsitologiya*. 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.* 92 (3) : 362—373. (Gromova L. V., Grefner N. M., Gruzdkov A. A., Komissarchik Ya. Yu. 2006. The role of facilitated diffusion in glucose transport across the apical membrane of the enterocytes. *Russ. J. Physiol.* 92 (3) : 362—373.)

Миронов А. А., Комиссарчик Я. Ю., Миронов В. А. 1994. Методы электронной микроскопии в биологии и медицине. СПб.: Наука. 400 с. (Mironov A. A., Komissarchik Ya. Yu., Mironov V. A. 1994. Electron microscopy methods in biology and medicine: study guide. St. Petersburg: Nauka. 400 p.)

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.* 65 (12) : 1849—1853. (Ugolev A. M., Zaripov B. Z. 1979. Technic of study of membrane digestion and absorption in small intestine during chronic experiments with rats and several other animals. *USSR J. Physiol.* 65 (12) : 1849—1853.)

Ait-Omar A., Monteiro-Sepulveda M., Poitou C., Le Gall M., Cotillard A., Gilet J., Garbin K., Houllier A., Chateau D., Lacombe A., Veyrie N., Hugol D., Tordjman J., Magnan C., Serradas P., Clément K., Leturque A., Brot-Laroche E. 2011. GLUT2 accumulation in enterocyte apical and intracellular membranes a study in morbidly obese human subjects and ob/ob and high fat-fed mice. *Diabetes*. 60 : 2598—2607.

Banan A., Zhang L. J., Shaikh M., Fields J. Z., Farhadi A., Keshavarzian A. 2004.  $\theta$ -Isoform of PKC is required for alterations in cytoskeletal dynamics and barrier permeability in intestinal epithelium: a novel function for PKC- $\theta$ . *Amer. J. Physiol. Cell Physiol.* 287 : C218—C234.

Bloom G. S., Goldstein L. S. 1998. Cruising along microtubule highways: how membranes move through the secretory pathway. *J. Cell Biol.* 140 : 1277—1280.

Bogan J. S. 2012. Regulation of glucose transporter translocation in health and diabetes. *Annu. Rev. Biochem.* 81 : 507—532.

Canania R. B., De Marcoa G., Passariello A., Buccigrossia V., Ruotoloa S., Bracalea I., Porcaroa F., Bifulcob G., Guarino A. 2006. Inhibitory effect of HIV-1 Tat protein on the sodium-D-glucose symporter of human intestinal epithelial cells. *AIDS*. 20 : 5—10.

Chaudhry R. M., Scow J. S., Madhavan S., Duenes J. A., Sarr M. G. 2012. Acute enterocyte adaptation to luminal glucose: a posttranslational mechanism for rapid apical recruitment of the transporter GLUT2. *J. Gastrointest. Surg.* 16 (2) : 312—319.

Gouyon F., Onesto C., Dalet V., Pages G., Leturque A., Brot-Laroche E. 2003. Fructose modulates GLUT5 mRNA stability in differentiated Caco-2 cells: role of cAMP-signaling pathway and

PABP (polyadenylated-binding protein)-interacting protein (Paip)2. *Biochem. J.* 375 : 167—174.

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 : 575—586.

Halbleib J. M., Sääf A. M., Brown P. O., Nelson W. J. 2007. Transcriptional modulation of genes encoding structural characteristics of differentiating enterocytes during development of a polarized epithelium *in vitro*. *Mol. Biol. Cell.* 18 : 4261—4278.

Jaulin F., Kreitzer G. 2010. KIF17 stabilizes microtubules and contributes to epithelial morphogenesis by acting at MT plus ends with EB1 and APC. *J. Cell Biol.* 190 : 443—460.

Kellett G. L., Brot-Laroche E., Mace O. J., Leturque A. 2008. Sugar absorption in the intestine: the role of GLUT2. *Annu. Rev. Nutr.* 28 : 35—54.

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.

Musch A. 2004. Microtubule organization and function in epithelial cells. *Traffic*. 5 : 1—9.

Robertson A. S., Smythe E., Ayscough K. R. 2009. Functions of actin in endocytosis. *Cell. Mol. Life Sci.* 66 : 2049—2065.

Rodriguez-Boulant E., Kreitzer G., Musch A. 2005. Organization of vesicular trafficking in epithelia. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6 : 233—247.

Suzaki E., Suzaki T., Kataoka K. 2004. Use of Taxol and collagenase for better three-dimensional visualization of microtubules in the enterocyte and Brunner's gland cell, with special reference to their relation to the Golgi apparatus. *J. Electron Microsc. (Tokyo)*. 53 : 79—86.

Suzuki T., Matsuzaki T., Hagiwara H., Aoki T., Tajika-Takahashi Y., Takata K. 2006. Apical localization of sodium-dependent glucose transporter SGLT1 is maintained by cholesterol and microtubules. *Acta Histochem. Cytochem.* 39 : 155—161.

Waschke J., Drenckhahn D. 2000. Uniform apicobasal polarity of microtubules and apical location of  $\gamma$ -tubulin in polarized intestinal epithelium *in situ*. *Eur. J. Cell Biol.* 79 : 317—326.

Weisz O. A., Rodriguez-Boulant E. 2009. Apical trafficking in epithelial cells: signals, clusters and motors. *J. Cell Sci.* 122 : 4253—4266.

Wright E. M., Hirsch J. R., Loo D. D. F., Zampighi G. A. 1997. Regulation of Na<sup>+</sup>/glucose cotransporters. *J. Exp. Biol.* 200 : 287—293.

Zheng Y., Sarr M. G. 2012. Translocation of transfected GLUT2 to the apical membrane in rat intestinal IEC-6 cells. *Dig. Dis. Sci.* 57 : 1203—1212.

Поступила 2 VI 2014

#### THE INTERACTION BETWEEN SGLT1 OR GLUT2 GLUCOSE TRANSPORTER AND THE CYTOSKELETON IN THE ENTEROCYTE AS WELL AS Caco2 CELL 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> I. P. Pavlov Institute of Physiology RAS, St. Petersburg;

\* e-mail: ngrefner@yandex.ru

The distribution of cytoskeleton elements (microtubules and actin filaments) and SGLT1 or GLUT2 glucose transporter in enterocyte of rat intestine and Caco2 cell during hexose absorption has been considered. The alteration of SGLT1 and GLUT2 transporter distribution in absorptive cell of intestine villus depending on maltose concentration has been determined using the confocal microscope. The colocalization of the transporters and actin has been revealed. The increase of vesicles number close to microtubules in the apical part of cell du-



ring absorption of high hexoze concentration has been found by electron microscope. The fact together with the transporter and actin as well as actin and  $\alpha$ -tubulin colocalizations can prove the participation of cytoskeleton elements in glucose transporter movement to apical membrane of the cells studied.

Key words: enterocyte, Caco2 cell, cytoskeleton, microtubule, actin, SGLT1 and GLUT2 transporter, glucose absorption.

---