

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
ИНСТИТУТ ЭВОЛЮЦИОННОЙ ФИЗИОЛОГИИ И БИОХИМИИ
им. И.М. СЕЧЕНОВА

На правах рукописи

БУРМАКИН

Михаил Викторович

ВСАСЫВАНИЕ БЕЛКОВ В ТОНКОМ КИШЕЧНИКЕ В ПОСТНАТАЛЬНОМ
ОНТОГЕНЕЗЕ У КРЫС

03.00.13 - Физиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Санкт-Петербург

2007

Работа выполнена в лаборатории физиологии почки и водно-солевого обмена
Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН

Научный руководитель

Академик РАН Ю.В. Наточин

Официальные оппоненты

доктор медицинских наук, профессор А.В. Смирнов

доктор медицинских наук, профессор А.Н. Шеповальников

Ведущее учреждение

Санкт-Петербургский государственный университет

Защита состоится « 13 » февраля 2007 г. в 11 часов
на заседании диссертационного совета Д 002. 127. 01 по защите диссертаций
на соискание ученой степени кандидата медицинских наук
в Институте эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН
по адресу: Санкт-Петербург, пр. Тореза, 44

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке
Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН

Автореферат разослан 28 декабря 2006 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

доктор биологических наук

М.Н. Маслова

Общая характеристика работы.

Актуальность проблемы. Согласно существующим представлениям белки в желудочно-кишечном тракте гидролизуются пептидазами в процессе пищеварения до аминокислот, ди- и трипептидов, которые при участии переносчиков абсорбируются клетками тонкой кишки в кровь (Adibi, 1997; Daniel, 2004). Считается, что нерасщепленные белки способны всасываться только при некоторых патологических состояниях, таких как шок, сепсис, панкреатическая недостаточность, воспалительные заболевания кишечника, аллергические заболевания (Fourrier, 1997; Knippels, Penninks, 2002; Bannon, 2004). Известно, что возможно всасывание интактных белков в желудочно-кишечном тракте на ранних стадиях постнатального развития млекопитающих (Зуфаров и др., 1974; Henning, 1987; Vendayan et al., 1994; Mostov, 1994). В то же время имеются данные, которые свидетельствуют о всасывании белков и у взрослых млекопитающих (Мазо и др., 1989; Dickenson et al., 1999). Недавно было показано, что нонапептид аргинин-вазопрессин, введенный в изолированную по методу Тири-Велла петлю тонкой кишки крыс, всасывается без гидролиза с сохранением антидиуретической активности (Наточин и др., 2003). Остается неясной судьба пептидов и белков, которые абсорбируются в кишке и поступают во внутреннюю среду организма в нерасщепленном виде. В связи с этим возникают следующие вопросы: способны ли клетки тонкой кишки у животных на начальных этапах онтогенеза всасывать непищевые чужеродные белки и сохраняется ли эта способность у взрослых особей, в каком органе происходит дальнейший метаболизм белков, и функционируют ли эти механизмы у млекопитающих и амфибий. Ответу на эти вопросы посвящено данное экспериментальное исследование.

Цель исследования. Цель работы заключалась в изучении возможности всасывания в тонкой кишке у крыс и лягушек нерасщепленного белка на примере зеленого (GFP) и желтого флюоресцентных белков (YFP), а также в выяснении роли почек в дальнейшей их утилизации на различных этапах постнатального онтогенеза.

Задачи исследования.

- 1) Разработка метода исследования метаболизма GFP и YFP в организме у крыс и лягушек после введения этих белков в просвет тонкой кишки.
- 2) Изучение всасывания GFP и YFP в кишке у крыс в различные периоды постнатального онтогенеза и у взрослых лягушек.
- 3) Исследование накопления GFP и YFP в почке и печени после их введения в кишечник у лягушек и у крыс.
- 4) Исследование всасывания GFP в тонкой кишке у крыс с развивающейся почечной недостаточностью (после удаления 5/6 почек) и аккумуляции GFP в оставшейся почке.

Научная новизна. Разработан новый метод для исследования всасывания и накопления в организме поступившего во внутреннюю среду нерасщепленного чужеродного белка на примере флюоресцентных белков. Впервые показано, что GFP и YFP после их введения зондом в желудок крыс или лягушек или непосредственно в тонкую кишку всасываются энтероцитами, а затем аккумулируются в эпителиальных клетках проксимальных канальцев нефрона. Установлено, что в раннем постнатальном онтогенезе у крыс всасывание флюоресцентных белков в кишке происходит интенсивнее, чем у взрослых животных. У частично нефрэктомированных крыс всасывание чужеродных белков и их накопление в почке снижено по сравнению с контролем.

Основные положения, выносимые на защиту.

- 1) GFP и YFP могут всасываться в тонкой кишке у крыс и лягушек нерасщепленными.
- 2) Всасывание GFP и YFP в энтероцитах происходит интенсивнее у крыс в ранние периоды постнатального онтогенеза, чем у взрослых животных.
- 3) Исследованные белки после их введения крысам и лягушкам зондом в желудок или в тонкую кишку накапливаются в эпителиальных клетках проксимального канальца почки, но не обнаруживаются в клетках печени.
- 4) У крыс через 2 месяца после удаления 5/6 почек снижается накопление

GFP в клетках проксимального отдела нефрона.

Научно-практическое значение работы. Результаты диссертации используются в курсах лекций по физиологии, читаемых на медицинском факультете Санкт-Петербургского государственного университета.

Апробация работы. Материалы диссертации доложены на Всероссийской конференции молодых исследователей “Физиология и медицина” (Санкт-Петербург, 2005), I съезде физиологов СНГ (Сочи, Дагомыс, 2005), XIII международном совещании и VI школе по эволюционной физиологии (Санкт-Петербург, 2006).

Публикации. По теме диссертации опубликована статья в отечественном реферируемом журнале и тезисы 3-х докладов.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 153 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, характеристики материала и методов исследования, 5 глав результатов исследования, обсуждения результатов, выводов, списка литературы, включающего 259 источников. Диссертация иллюстрирована 4 таблицами и 29 рисунками.

Материалы и методы исследования

Исследование выполнено на крысах (530 животных) и лягушках (60 особей). В опытах на крысах использованы взрослые самки линии Вистар и крысята в возрасте 5, 12 и 25 дней, а также крысы-самцы с частичной нефрэктомией. До экспериментов все животные содержались в стандартных условиях. В экспериментах были использованы самцы лягушек *Rana temporaria*, опыты на лягушках проводили в мае, животные содержались в холодильной камере при температуре +5°C.

В экспериментах *in vivo* ненаркотизированным крысам зондом в желудок вводили GFP (0,034, 0,34, 3,4, 6,8 мкг/мл), YFP (0,00365, 0,0365, 0,365, 3,65, 7,3 мкг/мл) из расчёта 100 мкл на 150 г массы животного на 0.01 М PBS-буфере (pH 7,3). В других опытах крыс наркотизировали путем внутрибрюшинной инъекции раствора 0,75 % нембутала и 0,37 % хлоралозы из расчета 0,5 мл на 100 г массы

животного. Этим крысам вскрывали брюшную полость по средней линии живота, затем разрезали стенку пищевода в нижней его части и через разрез вводили зонд из полиэтилена, через который вливали растворы GFP и YFP или флюоресцеин (8 мкг/мл) в аналогичных количествах.

Через различные интервалы времени (каждые 3 мин до 33 мин, а также через 60, 120, 180, 240 и 300 мин) после введения белков перорально или непосредственно в кишку, крыс декапитировали. Затем разрезали брюшную стенку по средней линии живота и выделяли для фиксации отрезок тонкой кишки длиной 2 см на расстоянии 20 см от двенадцатиперстной кишки, отрезок толстой кишки длиной 2 см на расстоянии 1-2 см от слепой кишки, а также фрагмент коркового вещества почки или фрагмент печени. В контрольных опытах животным вводили по 100 мкл на 150 г веса фосфатного буфера (PBS) без белков.

В опытах *in vitro* крыс декапитировали, и выделяли такой же, как описано выше, участок тонкой кишки. После этого на дистальную часть каждого из отрезков кишки накладывали лигатуру, а в просвет кишки вводили раствор GFP и YFP в тех же количествах, что и в опытах *in vivo*. Изолированные отрезки кишки помещали в раствор Рингера для теплокровных (37°C). Далее через каждые 3 минуты после начала инкубации фрагменты кишки фиксировали для морфологических исследований.

Лягушкам *in vivo* вводили через рот в желудок резиновый зонд и вливали 100 мкл раствора GFP на 150 г массы животного в концентрации 0,34 мкг/мл на 0.01 М PBS-буфере (pH 7,3). Через каждые 3 мин до 33 мин, а также через 120 и 300 мин после введения GFP лягушек обездвигивали, после чего разрезали брюшную стенку по средней линии живота и выделяли участок тонкой кишки или фрагмент почки для морфологических исследований.

Кусочки ткани фиксировали, замораживали и готовили из них гистологические срезы в криостате Leica CM1510 (Leica, Германия). Препараты изучали в флюоресцентном микроскопе TSC SL (Leica, Германия) с конфокальной

приставкой DM R (Leica, Германия), используя набор фильтров BP 450-490 и LP 515. На полученных имиджах с помощью компьютерной программы Image Tool III измеряли интенсивность флюоресценции клеток эпителия тонкой кишки и проксимального сегмента нефрона. Значение интенсивности выражали в условных единицах, которые рассчитывали как соотношение флюоресцирующих точек (пикселей) в пределах данного участка к несветящимся (шкала от 0 до 256). Сопоставляли интенсивность флюоресценции на равных по площади участках эпителия в разных вариантах опытов.

Данные обрабатывали статистически и представляли в виде $M \pm m$. Для сравнения и оценки достоверности различий использован *t*-тест Стьюдента. Использовали компьютерную программу Microsoft Excel Microsoft Office 2000.

Результаты исследования

Исследование слизистой оболочки тонкой кишки и эпителия почки крыс после введения зеленого и желтого флюоресцентных белков в кишку. Для того, чтобы исключить возможность токсического воздействия маркерных белков на ткани кишки и почки, были проведены предварительные эксперименты, в которых GFP и YFP применяли в различных концентрациях, а именно: 0,034, 0,34, 3,4, 6,8 мкг/мл – для GFP; 0,00365, 0,0365, 0,365, 3,65, 7,3 мкг/мл – для YFP. Было установлено, что после введения в кишку крысы этих белков в концентрации 0,034 мкг/мл для GFP и 0,00365 мкг/мл для YFP, флюоресценции, отличающейся от фоновой, в энтероцитах не выявлялось. При использовании белков в концентрации от 3,4 мкг/мл для GFP и от 0,365 мкг/мл для YFP обнаружено увеличение количества бокаловидных клеток в эпителии кишки, и повышена вакуолизация в эпителиальных клетках проксимального канальца нефрона, что считается проявлением реакции эпителия на неблагоприятное неспецифическое воздействие (Блюгер и др., 1970; Вайсброт, 1972). Для дальнейшей работы были использованы концентрации 0,34 мкг/мл для GFP и 0,0365 мкг/мл для YFP при этом сохранялась

целостность структур клеток эпителия и определялась специфическая флюоресценция.

Всасывание GFP и YFP в тонкой кишке. После введения в просвет кишки 150 мкл на 100 г массы животного GFP и YFP специфическая флюоресценция клеток кишечного эпителия у крыс всех возрастных групп выявлялась уже через 3 мин. У взрослых крыс увеличение интенсивности свечения характеризовалось наличием максимума флюоресценции на 21 мин после введения маркерных белков в кишку (GFP - $18,7 \pm 2,3$ усл. ед.; YFP - $33,7 \pm 5,2$ усл. ед.) с последующим понижением интенсивности свечения эпителиального слоя тонкой кишки (рис. 1). У 25-дневных крыс после введения GFP и YFP в кишку интенсивность свечения энтероцитов оказалась такой же, как у взрослых крыс (рис. 1). В опытах на 12-дневных крысятах специфическая флюоресценция GFP и YFP, выявляемая через 3 мин, была несколько выше ее средних значений у взрослых и 25-пятидневных крыс ($p < 0,001$). Максимум флюоресценции у 12-дневных крысят приходился на 15 мин после введения белка и равнялся $59 \pm 6,8$ усл. ед. для GFP и $58,8 \pm 6,3$ усл. ед. для YFP. У 5-дневных крысят максимум флюоресценции наблюдался еще раньше – уже на 9 мин после введения флюоресцентных белков, составив $90,0 \pm 10,5$ усл. ед. для GFP и $94,0 \pm 10,9$ усл. ед. для YFP. Значения максимумов у крыс всех возрастных групп достоверно отличались друг от друга ($p < 0,001$). Следовательно, чем меньше возраст крысы, тем быстрее и активнее происходит всасывание белка в кишке.

Распределение флюоресценции в энтероцитах после введения GFP и YFP в просвет кишки. Флюоресценция цитоплазмы эпителиальных клеток тонкой кишки была диффузной и выявлялась в случае GFP в виде зеленого свечения, а для YFP в виде желтого свечения, как это видно рис. 2. Наиболее интенсивная флюоресценция наблюдалась в энтероцитах у пятидневных крысят. Во всех вариантах экспериментов флюоресценция отсутствовала в области межклеточных контактов. Интенсивность свечения маркерных белков в апикальной области цитоплазмы энтероцитов во всех вариантах была примерно в 1,5 раза больше, чем в базальной.

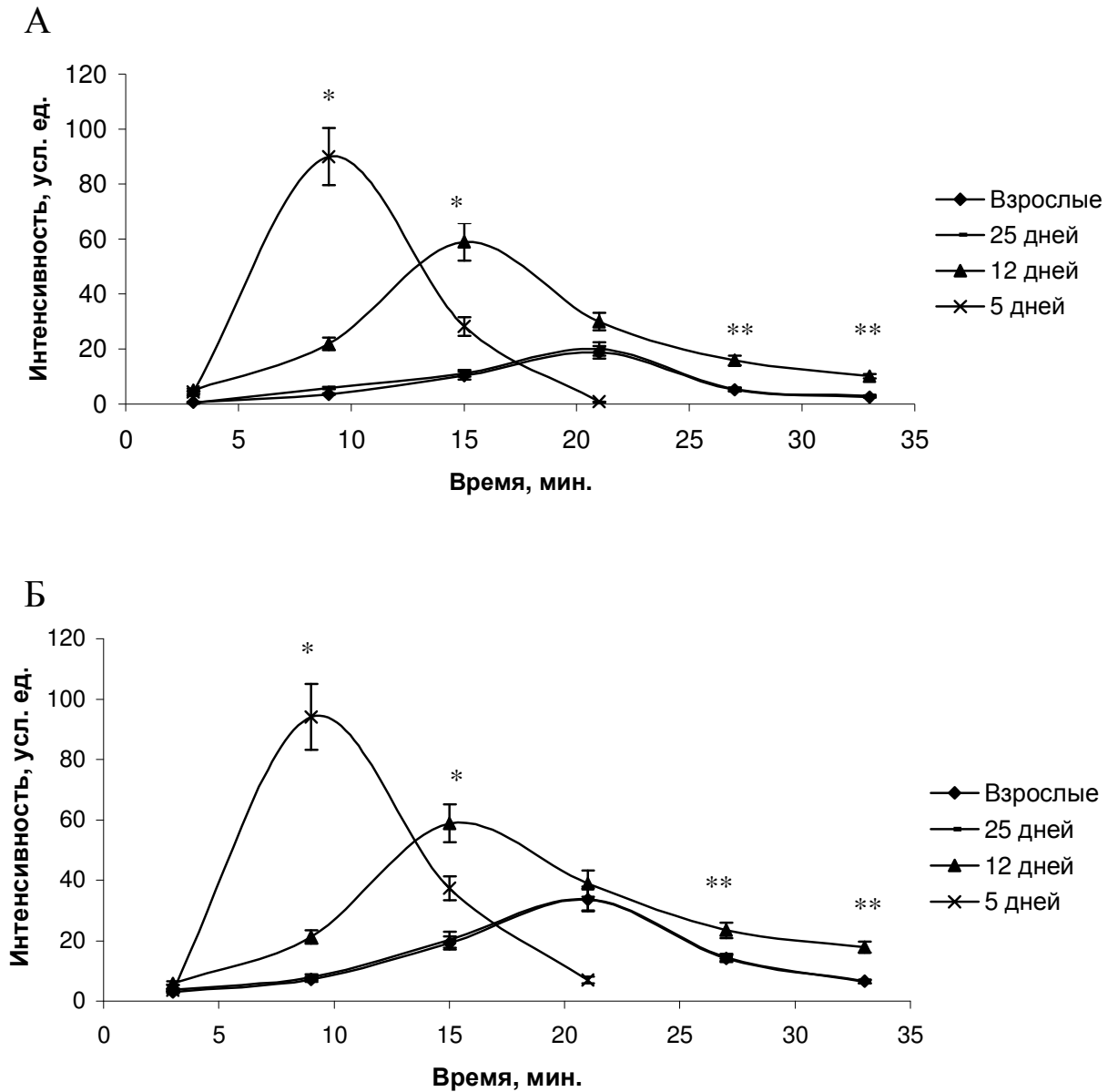


Рис. 1. Зависимость интенсивности флюоресценции клеток эпителиального слоя верхней трети ворсинки тонкой кишки от времени после введения GFP (А) и YFP (Б) в кишку у крыс разного возраста.

Абсцисса – время после введения GFP или YFP (100 мкл на 150 г массы животного), мин. Ордината – интенсивность флюоресценции в условных единицах. Достоверность отличий по отношению к взрослым крысам: * - $p < 0,001$; ** - $p < 0,01$.

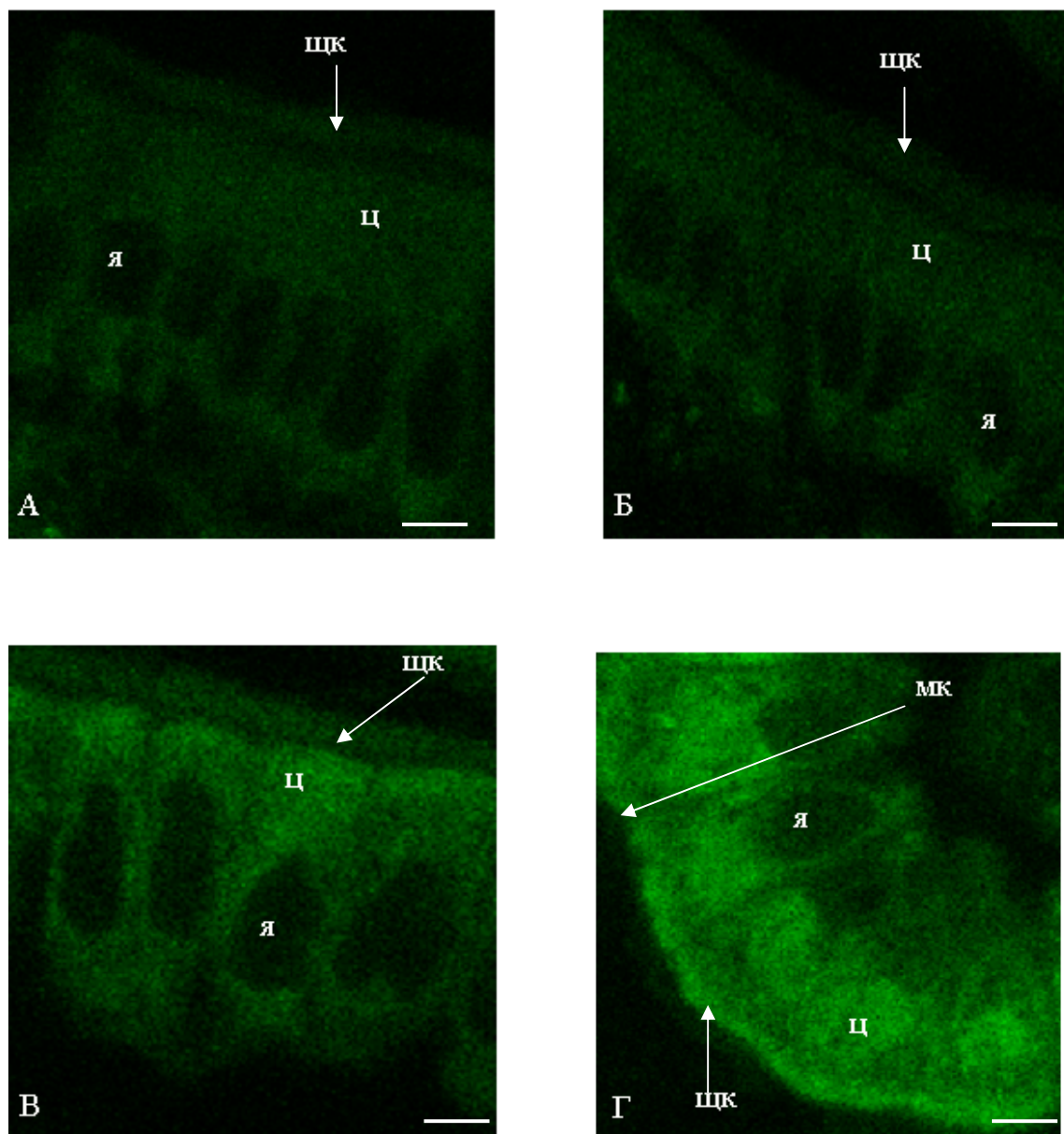


Рис. 2. Флюоресценция энтероцитов на максимуме эффекта после введения в просвет тонкой кишки раствора GFP взрослым крысам (А) и крысятам в возрасте 25 (Б), 12 (В) и 5 дней (Г).

Условные обозначения: МК – межклеточный контакт, ц – цитоплазма, щк – щеточная кайма, я – ядро. Время после введения GFP: 21 мин (А, Б), 15 мин (В), 9 мин (Г). Масштабная линейка на всех имиджах равна 10 мкм.

Флюоресценция после введения белка не была обнаружена в бокаловидных клетках эпителия кишки. В качестве контроля в этих экспериментах исследовали флюоресценцию в эпителии тонкой кишки без введения маркерных белков, в этом случае обнаруживалось только слабое неспецифическое свечение. В опытах с введением этих белков в просвет кишки специфической флюоресценции в клетках эпителия толстой кишки обнаружено не было.

Всасывание зеленого флюоресцентного белка в тонкой кишке лягушки. В опытах на лягушках показано, что специфическая флюоресценция GFP в эпителии тонкой кишки появлялась, как и у крыс, через 3 мин после его введения в просвет кишки. Максимальное свечение GFP в энтероцитах наблюдалось через 15 мин после введения маркерного белка в кишку ($29,0 \pm 3,6$ усл. ед.). К 33 мин интенсивность свечения в клетках эпителия тонкой кишки лягушки снижалась до уровня контрольных значений.

Динамика интенсивности свечения GFP в клетках кишечного эпителия лягушек была сходна с таковой у 12-дневных крысят (рис. 3).

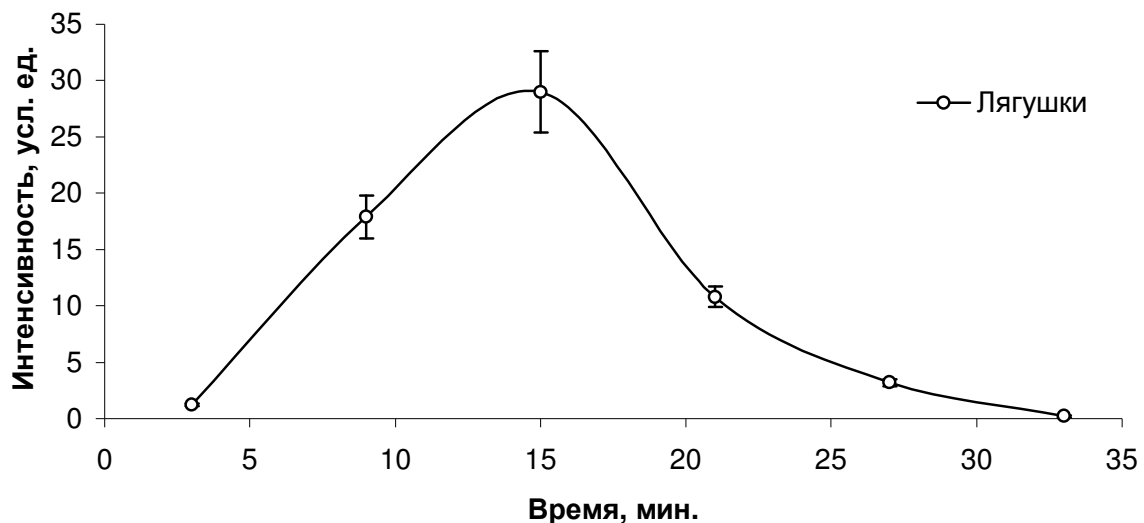


Рис. 3. Интенсивность флюоресценции эпителиального слоя верхней трети ворсинки энтероцитов тонкой кишки в зависимости от времени после введения GFP у лягушек. Абсцисса – время (100 мкл на 150 г массы животного), мин. Ордината – интенсивность флюоресценции в условных единицах.

Однако максимум флюоресценции у лягушек достоверно ниже ($p < 0,001$), чем у 12-дневных крысят. Флюоресценция после введения GFP в просвет кишки в энтероцитах тонкой кишки лягушек имела диффузный характер, как и у крыс. В экспериментах без введения GFP флюоресценция представлена в виде фонового свечения (рис. 3).

Всасывание зеленого флюоресцентного белка в тонкой кишке крыс после частичной нефрэктомии. Крысам через 2 месяца после удаления левой почки и 2/3 другой вводили 100 мкл раствора GFP на 150 г массы животного. В этих опытах величина флюоресценции эпителия тонкой кишки через 20 мин после введения составляла 17.4 ± 2.2 усл. ед., что достоверно не отличалось от значений флюоресценции у контрольных крыс – 18.7 ± 2.3 усл. ед. Флюоресценция в энтероцитах у крыс с частичной нефрэктомией носила диффузный характер.

Накопление зеленого и желтого флюоресцентных белков в проксимальных канальцах почки после их всасывания в желудочно-кишечном тракте крыс. Для выяснения путей метаболизма всосавшихся в кишке белков были исследованы ткани печени и почки. У исследованных животных не обнаружено флюоресценции в клетках печени после введения маркерных белков зондом в желудок или непосредственно в кишку.

После введения наркотизированным животным в кишку или ненаркотизированным животным перорально зондом растворов GFP или YFP наблюдалась специфическая флюоресценция клеток проксимального отдела нефрона у крыс всех исследованных возрастных групп, а также у лягушек (рис. 4). В тоже время свечения не наблюдалось в клетках дистальных канальцев почки. В клетках канальцев мозгового вещества почки крыс специфической флюоресценции GFP и YFP также не обнаружено.

У крысят разного возраста и взрослых крыс наблюдалась сходная динамика накопления флюоресцентных белков в клетках эпителия проксимальных канальцев. Специфическая флюоресценция в эпителии проксимальных канальцев у крыс всех

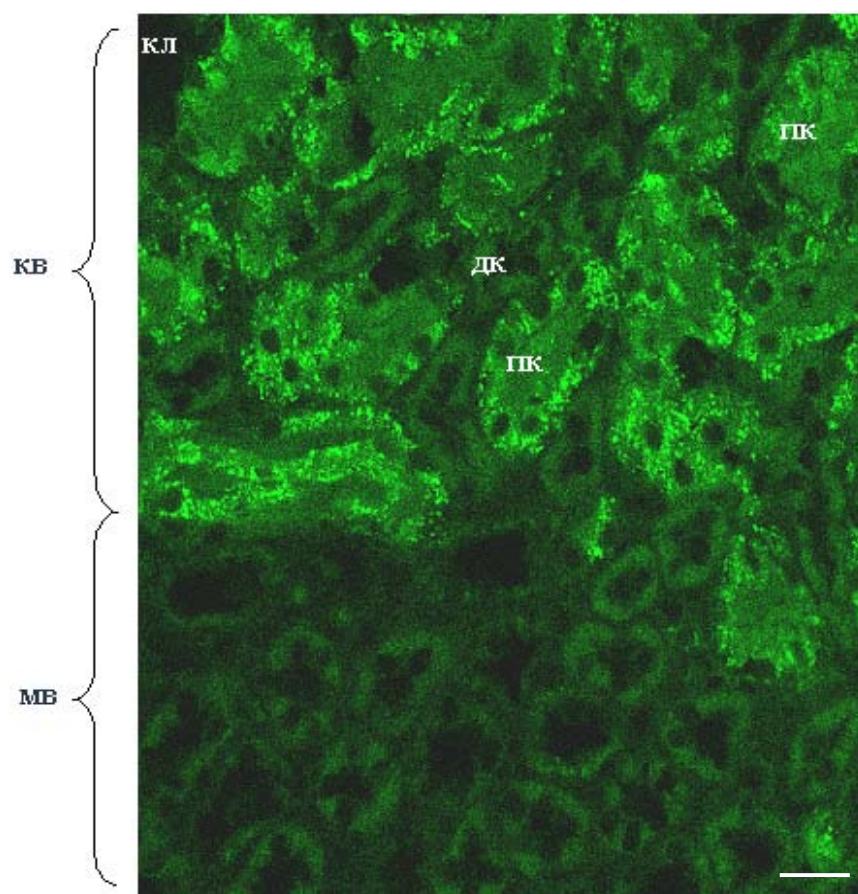


Рис. 4. Флюоресценция клеток эпителия мозгового и коркового вещества почки после введения 100 мкл раствора GFP на 150 г массы тела в просвет тонкой кишки. Условные обозначения: мв – мозговое вещество, кв – корковое вещество, дк – дистальный каналец, кл – клубочек, пк – проксимальный каналец. Масштабная линейка равна 100 мкм.

возрастных групп была обнаружена через 20 мин после введения маркерных белков, до этого времени (через 10 и 15 мин после введения белков) специфическая флюоресценция не выявлялась. Через 2 ч величина флюоресценции возростала (рис. 5).

Когда в опытах на взрослых крысах время после введения маркерных белков было увеличено до 5 ч, то было установлено, что флюоресценция продолжала увеличиваться и достигала наибольших значений, составив $74,2 \pm 8,3$ усл. ед. для GFP и $88,3 \pm 9,6$ усл. ед. для YFP. Наименьшие значения пиков интенсивности флюоресценции были зарегистрированы у взрослых крыс ($50,4 \pm 5,9$ усл. ед. для

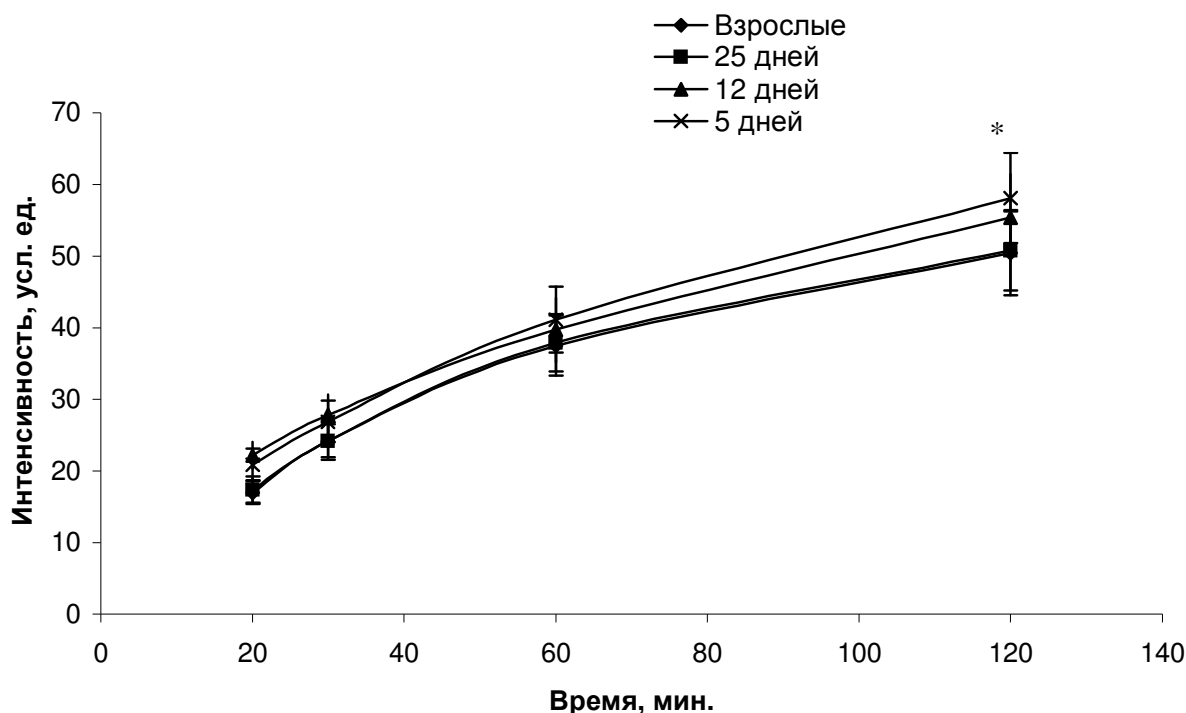


Рис. 5. Интенсивность флюоресценции клеток эпителия проксимального канальца почки в зависимости от времени после введения зондом (наружный диаметр не более 1 мм) в желудок GFP у крыс в различные периоды постнатального онтогенеза.

Абсцисса – время после введения GFP (100 мкл на 150 г массы животного), мин. Ордината – интенсивность флюоресценции в условных единицах. Достоверность отличий от взрослых крыс: * – $p < 0,001$.

GFP и $61,7 \pm 6,4$ усл. ед. для YFP), а наибольшие – у 5- дневных крысят ($58,1 \pm 6,5$ усл. ед. для GFP и $72,5 \pm 7,7$ усл. ед. для YFP). Эти данные достоверно отличаются друг от друга ($p < 0,001$). Таким образом, чем меньше возраст животного, тем интенсивнее происходит накопление флюоресцентных белков в клетках эпителия проксимальных канальцев нефрона.

Характер распределения маркерных белков в клетках проксимального канальца. Распределение флюоресценции в цитоплазме клеток проксимального канальца нефрона почки было неравномерным. У крыс всех возрастных групп интенсивная флюоресценция была распределена в этих клетках в виде образований

округлой формы размером 0,5-2,0 мкм и с характерным зеленым свечением в случае с GFP и желтым после введения YFP (рис. 6). Через 20 мин после введения белка в кишку эти структуры были локализованы преимущественно в апикальной области цитоплазмы, через 2 ч они выявлялись во всей цитоплазме. У взрослых крыс через 2 ч после введения маркерных белков в кишку на полученных имиджах визуализировались единичные флюоресцирующие гранулы. В эпителиальных клетках проксимального канальца 12-дневных крысят количество гранул со специфической флюоресценцией было больше, чем у взрослых и 25-дневных крыс, и они выявлялись по всей площади цитоплазмы, достигая диаметра 1-1,5 мкм. У 5-дневных крыс через 2 ч после введения GFP и YFP в кишку флюоресцирующие гранулы также были распределены по всей цитоплазме. Единичные гранулы достигают размера до 2 мкм, более крупные гранулы, по-видимому, являлись результатом слияния мелких гранул и характеризовались более интенсивным свечением. В экспериментах с введением раствора PBS без флюоресцентных белков специфического свечения в клетках эпителия проксимального канальца нефрона выявлено не было ни в одном из вариантов опытов.

Накопление зеленого флюоресцентного белка в клетках эпителия проксимальных канальцев почки после его всасывания в желудочно-кишечном тракте у лягушек.

Динамика накопления GFP у лягушек в проксимальных канальцах почки такая же, как и у крыс. Флюоресценция клеток эпителия проксимального канальца выявляется через 20 мин после введения GFP в желудок, а пик флюоресценции наблюдается через 5 ч ($117,6 \pm 10,3$ усл. ед.). Таким образом, скорость увеличения интенсивности свечения GFP в клетках проксимального канальца почки лягушек и крыс различных возрастных групп близка, но интенсивность свечения GFP через 5 ч после его введения у лягушек выше. Характер распределения GFP в клетках эпителия проксимального канальца нефрона был аналогичен распределению этого белка у крыс. Через 5 ч после перорального введения GFP в цитоплазме эпителиальных клеток обнаруживались флюоресцирующие гранулы, размером 1,5-

2 мкм (рис. 7А). При введении раствора PBS без GFP наблюдалось лишь слабое фоновое свечение (рис. 7Б).

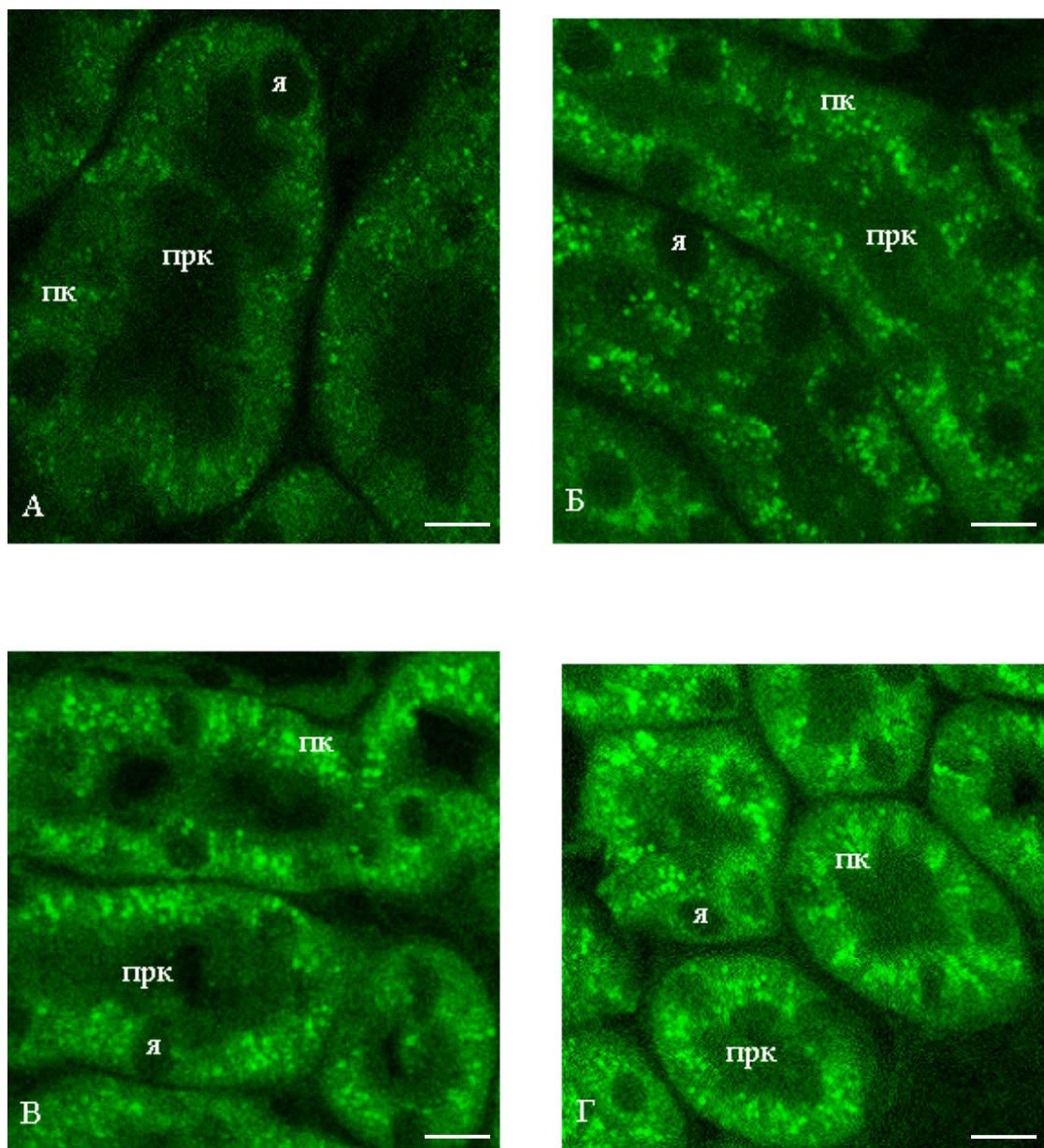


Рис. 6. Флюоресценция в клетках эпителия проксимального канальца почки через 2 ч введения после введения в просвет тонкой кишки раствора GFP у взрослых крыс (А), 25-дневных крысят (Б), 12-дневных крысят (B), 5-дневных крысят (Г).

Условные обозначения: пк – проксимальный каналец, прк – просвет канальца, я – ядро. Масштабная линейка на всех имиджах равна 10 мкм.

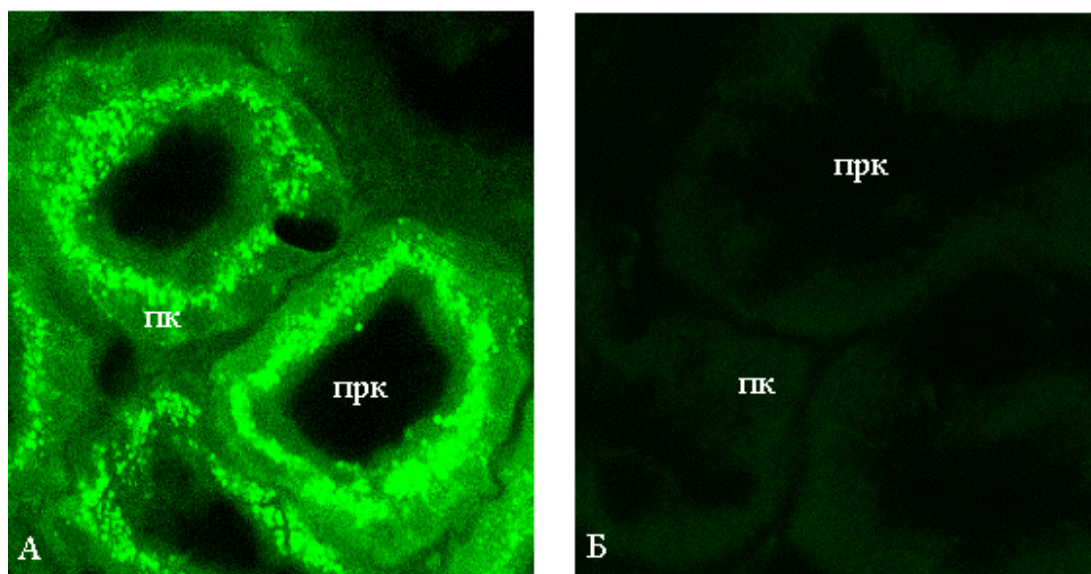


Рис. 7. Флюоресценция в клетках проксимального канальца почки лягушек через 5 ч после введения в желудочно-кишечный тракт раствора GFP (А) или в контрольных экспериментах (Б) *in vivo*. Условные обозначения – см. рис. 6. Масштабная линейка на всех имиджах равна 10 мкм.

Накопление зеленого флюоресцентного белка в проксимальных канальцах почки после его всасывания в желудочно-кишечном тракте у крыс с частичной нефрэктомией. Накопление GFP в клетках проксимальных канальцев у крыс с частичной нефрэктомией было ниже, чем у контрольных крыс. Характер распределения GFP в клетках эпителия проксимального канальца у крыс с частичной нефрэктомией аналогичен описанному выше распределению этого белка у неоперированных крыс (рис.8).

Накопление флюоресцеина в проксимальных канальцах почки после его всасывания в желудочно-кишечном тракте. После введения 100 мкл флюоресцеина на 150 г массы животного в просвет тонкой кишки взрослых крыс оценивали характер его накопления. Интенсивное свечение обнаруживалось в клетках проксимального канальца, оно характеризовалось диффузным распределением по

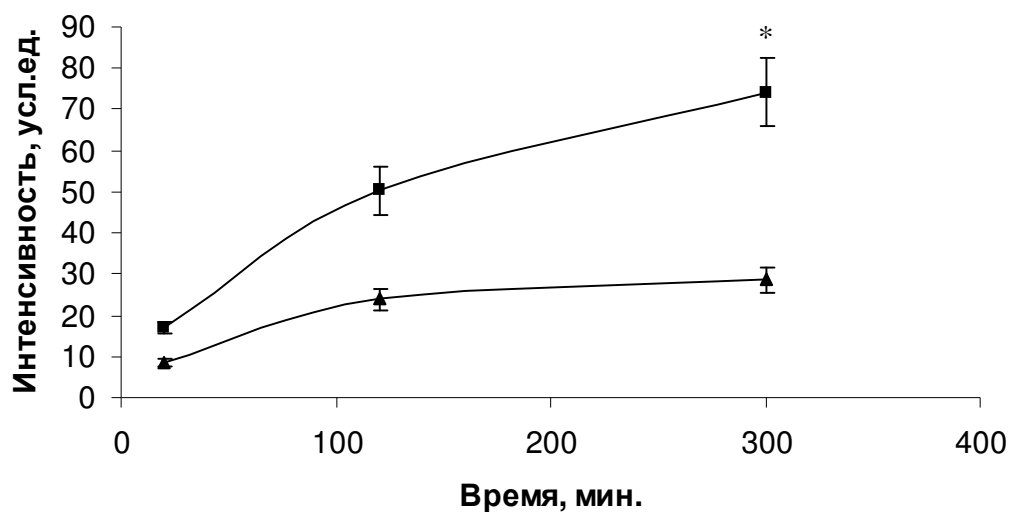


Рис. 8. Динамика флюоресценции клеток эпителия проксимального канальца почки после введения GFP в желудочно-кишечный тракт крыс с частичной нефрэктомией. Абсцисса – время, мин. Ордината – интенсивность флюоресценции в условных единицах; ▲ – частичная нефрэктомия, ■ – контроль; n=100. Достоверность отличий от крыс с частичной нефрэктомией: * – $p < 0,001$.

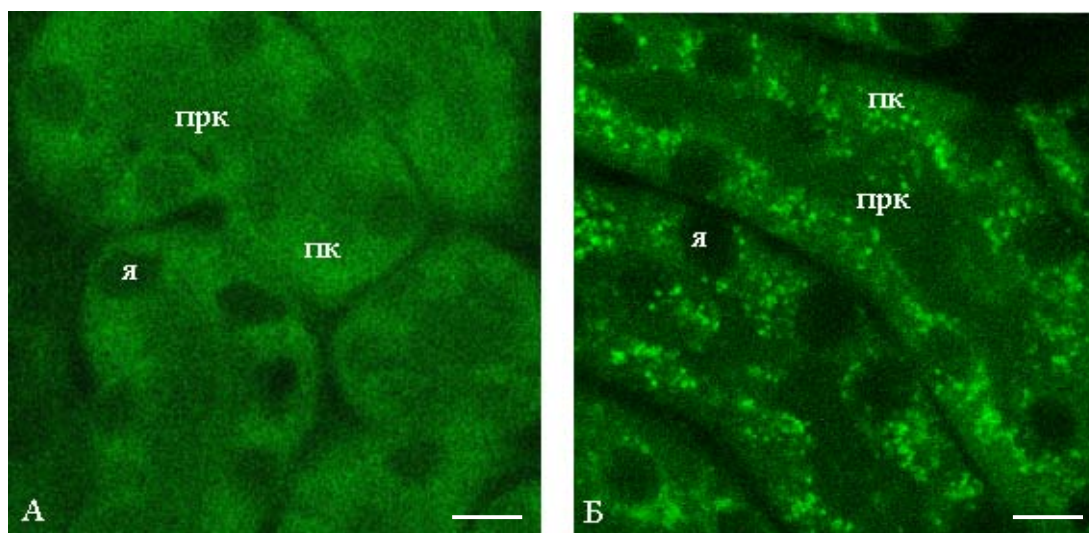


Рис. 9. Флюоресценция клеток эпителиального слоя проксимального канальца почки после введения в просвет тонкой кишки флюоресцеина (А) или раствора GFP (Б) у взрослых крыс. Эксперименты *in vivo*, время после введения флюоресцеина и GFP 2 часа.

Условные обозначения: пк - проксимальный каналец, прк – просвет канальца, я – ядро. Масштабная линейка на всех имиджах равна 10 мкм.

цитоплазме (рис. 9А), в отличие от распределения маркерных белков, после введения которых флюоресценция была представлена в виде образований округлой формы (рис. 9Б).

Заключение

Задача работы заключалась в выяснении судьбы чужеродного белка, всосавшегося в кишке. В настоящее время не разработаны методы изучения всасывания нерасщепленных белков и полипептидов, нет данных для суждения о том, сколь широко распространено это явление в животном мире. Мы исследовали возможность всасывания в тонкой кишке флюоресцентного белка, который обладает флюоресценцией только при сохранении интактной структуры молекулы. Речь идет, в частности, о GFP, у которого только молекулы с сохраненной третичной структурой обладают флюоресценцией (Tsien, 1998). Для решения физиологической задачи – всасывания в кишке и аккумуляции в почке такого белка нами был использован высокочувствительный метод – конфокальная лазерная флюоресцентная микроскопия. Были использованы белки – GFP и YFP.

Была установлена флюоресценция в энтероцитах после введения в просвет кишки GFP и YFP, что свидетельствует о всасывании этих маркерных белков через люминальную мембрану в тонкой кишке. Полученные данные о всасывании флюоресцентных белков у крысят разного возраста согласуются с известными фактами всасывания пищевых белков материнского молока у млекопитающих в раннем онтогенезе (Ogra et al., 1977; Walker, 1986). Полученные результаты свидетельствуют о том, что всасываться в кишечнике млекопитающих могут не только белки, являющиеся обычными компонентами пищи, но и чужеродные белки, такие как GFP и YFP.

Продемонстрирована возможность всасывания флюоресцентных белков в тонкой кишке лягушек в экспериментах *in vivo*. Динамика всасывания флюоресцентных белков в эпителии тонкого кишечника у лягушек подобна динамике накопления этих белков у двенадцатидневных крысят.

Для решения вопроса о дальнейшей судьбе всосавшихся в кишке белков были исследованы клетки печени и проксимального канальца нефрона. GFP и YFP не были обнаружены в клетках печени после их перорального введения крысам, но было отмечено их накопление в эпителиальных клетках проксимального канальца нефрона. Можно предположить, что всасываемые флюоресцентные белки поступают в порталный кровоток, но не извлекаются клетками печени и с током крови поступают в почки, фильтруются в ее клубочках, затем реабсорбируются клетками проксимального канальца, которые обеспечивают поступление в клетки профильтрованных белков для их последующего гидролиза.

Исследование флюоресценции эпителия проксимального канальца нефрона лягушек и крыс после введения маркерных белков в тонкую кишку свидетельствует о том, что аккумуляция белков, прошедших через эпителиальный барьер кишки без гидролиза и поступивших в кровь, происходит в почке как млекопитающих, так и лягушек. Накопление флюоресцентных белков клетками проксимального канальца нефрона у крыс с частичной нефрэктомией ниже, чем у контрольных животных.

Полученные данные дают основания считать, что наряду с классической схемой гидролиза пептидов и белков до аминокислот в кишечнике и их использования для построения эндогенных белков, существует еще один путь метаболизма белков. Начальным этапом этого пути является частичное всасывание белков в тонкой кишке в нерасщепленном виде и поступление чужеродного белка в кровь. Можно полагать, что после всасывания в кишке белок, поступивший в кровь, фильтруется в почечных клубочках и реабсорбируется из канальцевой жидкости клетками проксимальных канальцев нефрона.

Выводы

1. Разработан метод исследования всасывания флюоресцентных белков в тонкой кишке после введения белков зондом в желудок или непосредственно в тонкую кишку с помощью конфокальной флюоресцентной микроскопии.

2. У крыс показано всасывание в нерасщепленном виде зеленого или желтого флюоресцентных белков, флюоресценция в энтероцитах распределяется в цитоплазме диффузно, свечение выше в апикальной области цитоплазмы по сравнению с базальной. Зеленый и желтый флюоресцентные белки не абсорбируются клетками толстой кишки и не обнаруживаются в клетках печени.
3. Динамика всасывания у крыс характеризуется появлением флюоресценции в энтероцитах через 3 мин после введения белков в кишку, флюоресценция нарастает до максимума с последующим снижением через 20-30 мин до фоновых значений.
4. У крыс скорость всасывания маркерных белков и максимум флюоресценции в энтероцитах снижаются с возрастом животных.
5. После всасывания в тонкой кишке крыс и лягушек флюоресцентные белки поступают с током крови в почки и накапливаются в эпителиальных клетках проксимального канальца нефрона в виде флюоресцирующих округлых образований диаметром 0.5-2.0 мкм.
6. У лягушек, как и у крыс, показано всасывание флюоресцентных белков в энтероцитах и их аккумуляция в эпителиальных клетках проксимального канальца почки. Величина и динамика свечения зеленого флюоресцентного белка в энтероцитах у лягушек сходны с таковыми у двенадцатидневных крысят, максимум флюоресценции в эпителиальных клетках проксимального канальца нефрона выше, чем у крыс.
7. У крыс с развивающейся почечной недостаточностью (через 2 мес после частичной нефрэктомии) снижена аккумуляция зеленого флюоресцентного белка в эпителии проксимального канальца.
8. Сделано заключение, что зеленый и желтый флюоресцентные белки могут абсорбироваться в энтероцитах без гидролиза, а после их всасывания в кровь реабсорбироваться и аккумуляроваться в эпителиальных клетках проксимальных канальцев нефрона, что свидетельствует о важной роли

почки в утилизации чужеродных белков. Этот путь поступившего в желудочно-кишечный тракт белка впервые показан у крыс в различные периоды постнатального онтогенеза, крыс с компенсаторной гипертрофией почки, а также у лягушек.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

I. Статья в реферируемом журнале:

1. Бурмакин М.В., Селивёрстова Е.В., Наточин Ю.В. “Накопление желтого флюоресцентного белка в почке после его всасывания в кишечнике у крыс”. Росс. физиол. журн. им И.М. Сеченова, 2005, т. 91, N. 10, с. 1195-1204.

II. Тезисы докладов:

1. Бурмакин М.В., Селивёрстова Е.В. “Иммунофлюоресцентный анализ распределения GFP в эпителии тонкого кишечника у крыс”. Вестник молодых ученых. Серия “Физиология и медицина”. Сборник материалов Всероссийской конференции молодых исследователей, 14-16 апреля 2005 года, Санкт-Петербург, “Физиология и медицина”, с.17.

2. Бурмакин М.В., Селивёрстова Е.В., Наточин Ю.В. “Накопление флюоресцентных белков GFP и YFP в почке после их всасывания в тонком кишечнике крыс”. Научные труды I съезда физиологов СНГ (Сочи, Дагомыс, 2005 г.), т. 2, с. 90-91.

3. Бурмакин М.В., Селивёрстова Е.В. “Накопление в почке зеленого и желтого флюоресцентных белков после их всасывания в кишечнике крыс в постнатальном онтогенезе”. XIII международное совещание и VI школа по эволюционной физиологии (Санкт-Петербург, 2006 г.), с.39.