

© Н.П. Пруцкова, Е.В. Селивёрстова, 2009  
УДК 612.015.348:611:599.323.4

*Н.П. Пруцкова и Е.В. Селивёрстова*

## **ВСАСЫВАНИЕ ЗЕЛЕННОГО ФЛЮОРЕСЦЕНТНОГО БЕЛКА КЛЕТКАМИ ПРОКСИМАЛЬНЫХ КАНАЛЬЦЕВ ПОЧКИ КРЫСЫ И НАКОПЛЕНИЕ В НИХ ПРИ УВЕЛИЧЕНИИ ЕГО ПОСТУПЛЕНИЯ В КРОВЬ**

Лаборатория физиологии почки и водно-солевого обмена (зав. — академик РАН Ю.В. Наточин) Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, e-mail: prutsk@iephb.ru

Методом лазерной конфокальной микроскопии исследовали всасывание зеленого флюоресцентного белка (GFP) в проксимальных канальцах почки у анестезированных крыс при введении GFP в кровь или тонкую кишку. Установлена корреляция между величиной специфической флюоресценции в клетках проксимальных канальцев и логарифмом дозы введенного в вену GFP ( $r=0,96$ ,  $P<0,05$ ). Флюоресценция GFP после внутривенных инъекций превышала флюоресценцию, обусловленную введением GFP в тонкую кишку ( $P<0,05$ ). С повышением дозы введенного GFP в цитоплазме эпителиоцитов, наряду с диффузным свечением, выявлялись крупные пузырьки с высоким уровнем флюоресценции, что подтверждено графическим анализом. Выявленные изменения интенсивности и характера специфической флюоресценции свидетельствуют о повышении всасывания GFP в клетках проксимальных канальцев и накоплении во внутриклеточных компартментах при увеличении его поступления в кровь.

**Ключевые слова:** почка, проксимальный каналец, тонкая кишка, зеленый флюоресцентный белок (GFP), конфокальная микроскопия.

Установлено, что в пищеварительном тракте могут всасываться интактные белковые макромолекулы, и в эпителиальных клетках тонкой кишки осуществляется их всасывание и транзитоз [5, 7, 12, 19]. В опытах *in vivo* и *in vitro* с использованием метода конфокальной микроскопии продемонстрировано всасывание зеленого (green fluorescent protein — GFP) и желтого флюоресцентных белков эпителиоцитами тонкой кишки крысы и лягушки с последующим накоплением в клетках проксимальных канальцев (ПК) почки [1 — 3, 11]. Акцентировано внимание на том, что, наряду с продуктами гидролиза белков и пептидов, являющихся обычными компонентами пищи, в пластический обмен могут вовлекаться чужеродные белки, преодолевшие кишечный барьер и реабсорбированные в почке. В то же время показано, что специфическая флюоресценция в клетках ПК возрастает с увеличением промежутка времени после введения GFP в пищеварительный тракт [11]. Можно полагать, что постепенное накопление GFP в почке обусловлено прежде динамикой его всасывания в различных сегментах тонкой кишки и отдельных энтероцитах. Неизвестно, однако, как GFP накапливается в почке по мере увеличения его поступления в кровь, достигаемого разными способами. Предстояло выяснить, как происходит захват и накопление GFP в клетках ПК почки при введении этого белка в кровь или тонкую кишку в различных дозах, что и явилось задачей исследования.

Материал и методы. Работа выполнена на крысах-самках линии Вистар в возрасте 3–4 мес. Животных

наркотизировали введением раствора (0,6 мл/100 г, внутривенно), содержащего 0,75% нембутала и 0,37% хлоралозы. Опыты проведены в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ № 755 от 12.08.1977 г. МЗ СССР). Использовали GFP, полученный в лаборатории механизмов биосинтеза белка Института белка РАН (г. Пушкино-на-Оке). Раствор GFP готовили на 0,01 М фосфатно-солевом буфере (PBS), pH 7,3, белок вводили в концентрации 0,34; 3,4; 34 и 340 мкг/мл и объеме 100 мкл/150 г массы тела (в пересчете на 100 г массы — 0,023; 0,23; 2,3 и 23 мкг GFP соответственно). Контрольным животным вводили PBS в аналогичном объеме. В каждом из вариантов опыта и в контрольных экспериментах использовали по 5 крыс. Инъекцию в бедренную вену осуществляли с помощью инсулинового шприца в течение 10–15 с. При введении растворов в кишку накладывали лигатуру выше места введения, и в нижнюю треть двенадцатиперстной кишки через небольшой надрез в ее стенке вводили нужный раствор с помощью насаженного на шприц полиэтиленового зонда с наружным диаметром не более 1 мм и длиной 5 см. После извлечения зонда быстро накладывали лигатуру ниже надреза стенки кишки, сшивали края брюшины, и накладывали шов на кожу живота. Через 2 ч после введения GFP или PBS (в отдельных опытах — через 30 мин) извлекали почку. Образцы тканей почки для конфокальной микроскопии готовили описанным ранее способом [1, 2]. Препараты изучали в микроскопе TSC SL (Leica, Германия) с лазерной сканирующей конфокальной приставкой DM R (Leica, Германия).

На срезах коркового вещества почки (об. 63, ок. 10.) в перигломерулярных областях выбирали группы ПК, и в режиме лазерного сканирования получали изображения при идентичных параметрах работы микроскопа. У каждого животного анализировали флюоресценцию в эпителиоцитах 100 ПК. Используя компьютерную программу Image Tool III, рассчитывали величину свечения (в условных единицах, соответствующих градациям серого цвета по шкале от 0 до 256, где 0 соответствует абсолютно черному цвету, а 256 — абсолютно белому). Данные представлены в виде средней

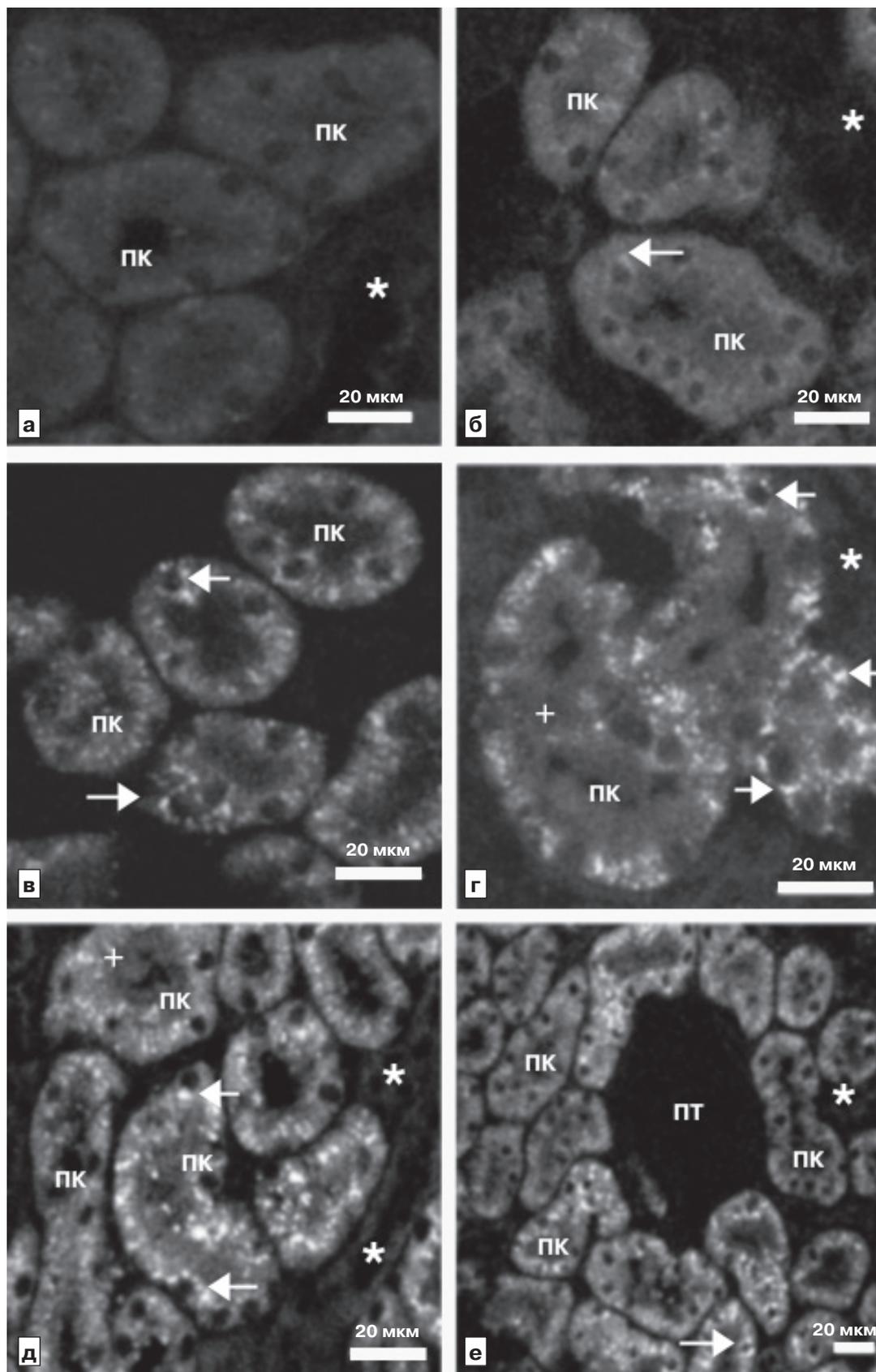


Рис. 1. Флюоресценция в эпителиоцитах проксимальных канальцев почки крысы через 2 ч после внутривенного введения зеленого флюоресцентного белка (GFP).

а — контроль; б — е — введение GFP (мкг/100 г): 0,023 (б), 0,23 (в), 2,3 (г), 23 (д, е). ПК — проксимальный каналец; ПТ — почечное тельце; + — исчерченная кайма; \* — другие части нефрона; стрелки — флюоресцирующие пузырьки вблизи ядер клеток.

арифметической с ее стандартной ошибкой, величину специфической флюоресценции определяли как разность между средними значениями флюоресценции после введения GFP и в контроле, с соответствующей ошибкой разности. Различия между выборочными показателями считали статистически значимыми при  $P < 0,05$  (t-тест Стьюдента). Использовали пакеты программ «Statistica 6.0» и «Microsoft Office Excel 2003».

**Результаты исследования.** На полученных изображениях идентифицировали ПК нефронов (на основании размеров клеток, расположения их ядер в эпителиальном пласте, а также наличия исчерченной каемки). Собственная флюоресценция в эпителиоцитах ПК была незначительной (рис. 1, а), но превышавшей свечение в других структурах коркового вещества почки (дистальных канальцах, собирательных трубочках, почечных тельцах). У контрольных животных, которым вводили PBS в вену, она составила  $17,21 \pm 0,20$  усл. ед. и практически не отличалась от флюоресценции после введения PBS в кишку ( $17,40 \pm 0,20$  усл. ед.). После введения GFP флюоресценция усиливалась, и различия между ее величинами в опыте и контроле в каждой серии экспериментов были статистически значимыми ( $P < 0,001$ ). Это свидетельствовало о наличии специфической флюоресценции, обусловленной свечением GFP, и позволяло сравнить ее величину при использовании разных доз и способов введения GFP. После инъекции GFP в количестве 0,023 и 0,23 мкг/100 г свечение в цитоплазме эпителиоцитов ПК было достаточно равномерным, в то же время в отдельных клетках присутствовали светящиеся образования округлой формы, диаметром до 0,5–1 мкм, часто расположенные вблизи ядер (см. рис. 1, б, в). С увеличением количества введенного белка диффузное распределение флюоресценции становилось более дискретным, что выражалось в увеличении в различных участках цитоплазмы числа включений с большей интенсивностью свечения (см. рис. 1, г). Специфическая флюоресценция в эпителиоцитах ПК возрастала пропорционально количеству введенного GFP и была значимо выше после внутривенных инъекций, чем после введения аналогичных количеств GFP в тонкую кишку (рис. 2). Установлена высокая положительная корреляция между величиной специфической флюоресценции и логарифмом дозы введенного в вену GFP ( $r=0,96$ ,  $P < 0,05$ ).

При внутривенном введении крысам GFP в количестве 23 мкг/100 г массы тела характер флюоресценции в эпителиоцитах ПК существенным образом изменился. Наряду с усилением свечения цитоплазмы в целом, включая области с диффузным свечением и дискретные образования, отмечено появление округлых образований, имеющих вид ярких флюоресцирующих гранул диаметром от 0,5 до 2 мкм (см. рис. 1, д, е; 3, в). Их отличительным признаком была флюоресценция,

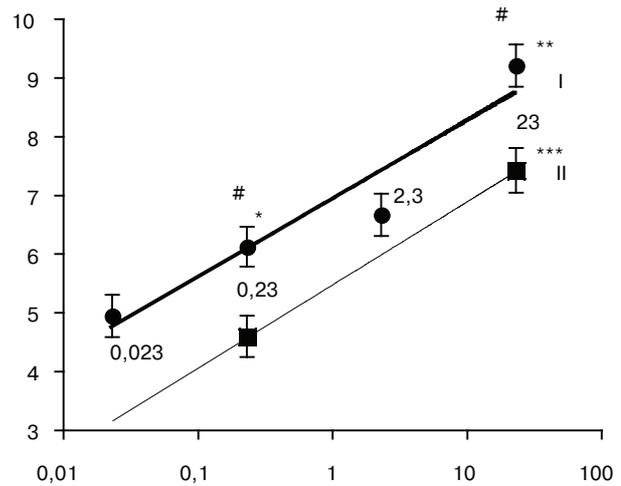


Рис. 2. Специфическая флюоресценция в эпителиоцитах проксимальных канальцев почки крысы после введения зеленого флюоресцентного белка (GFP) в различных дозах.

По оси абсцисс — доза GFP (мкг/100 г); по оси ординат — величина флюоресценции (усл. ед.); I — введение GFP в вену; II — введение GFP в тонкую кишку; числа на графике — вводимая доза GFP (мкг/100 г). Различия между величиной флюоресценции и ее предыдущим значением при меньшей дозе GFP значимы: \* при  $P < 0,05$ ; \*\* при  $P < 0,01$ ; \*\*\* при  $P < 0,001$ ; # различия между величиной флюоресценции после введения GFP в вену и кишку в аналогичной дозе значимы при  $P < 0,05$ . Вертикальные отрезки — значения стандартной ошибки.

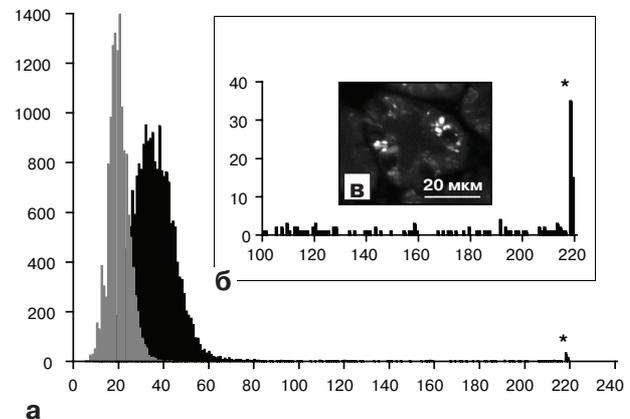


Рис. 3. Распределение флюоресценции в эпителиальном пласте отдельного проксимального канальца.

а, б — по оси абсцисс — величина флюоресценции (усл. ед.); по оси ординат — число элементов изображения (пикселей). а — распределение в контроле (гистограмма серого цвета) и после введения GFP, 23 мкг/100 г массы (черная гистограмма); б — распределение в области высоких значений свечения (часть гистограммы после введения GFP, в другом масштабе); в — проксимальный каналец с флюоресцирующими гранулами в клетках эпителиального пласта; звездочка — второй пик гистограммы.

значительно (в 5–8 раз) превышавшая свечение (в усл. ед.) в других частях цитоплазмы. Число таких гранул в клетке варьировало от 1–2 до 5 и более, они присутствовали как в апикальной зоне клеток, так и в базальной, и часто — вокруг ядер. Этот

феномен был характерен для всех пяти крыс, которым GFP в указанной выше дозе вводили внутривенно, и отмечен только у одного животного (из шести) после введения GFP в кишку. Изменения характера и интенсивности флюоресценции подтверждаются графическим анализом (см. рис. 3). В случае введения GFP гистограмма и ее пик сдвинуты вправо по сравнению с контролем (см. рис. 3, а), что отражает увеличение интенсивности свечения. Кроме того, в распределении свечения появляются частоты в области значений более 60–80 усл. ед. и 2-й пик гистограммы (см. рис. 3, а, б), величина которого пропорциональна числу светящихся гранул с наиболее высокой флюоресценцией (см. рис. 3, в).

**Обсуждение полученных данных.** Установлено, что молекулы GFP обладают флюоресценцией только при целиком сохраненной третичной структуре [14], поэтому появление специфической флюоресценции в эпителиоцитах ПК почки свидетельствует о присутствии в них интактных молекул этого белка. Таким образом, GFP, как всосавшийся из кишки, так и введенный непосредственно в кровь, проходя через клубочковый фильтрационный барьер, захватывается эпителиоцитами ПК.

Как известно, реабсорбированные из канальцевой жидкости белки в лизосомах эпителиоцитов подвергаются деградации с различной скоростью, обусловленной многими факторами. При некоторых условиях она, как показано для лизоцима, может превышать скорость реабсорбции [8]. Введенный в кровь меченый аprotинин удерживается в эпителиоцитах ПК более 20 мин, а после инъекции цистатина С продукты его гидролиза появляются в перитубулярных капиллярах уже через 5 мин [13]. Через 100 мин в почке обнаруживается только 30% введенного лизоцима [10]. Известно, что GFP обладает повышенной устойчивостью к действию протеолитических ферментов [9], что подтверждается динамикой его флюоресценции в живых клетках и организмах в течение 1–3 сут и более [16]. Специфическая флюоресценция в эпителиоцитах ПК почки у крыс, в том числе у животных с экспериментальной почечной недостаточностью, возрастала в течение 5 ч после введения в пищеварительный тракт даже небольших количеств GFP (что было бы невозможным в случае быстро начинающегося процесса деградации), и увеличение было наиболее существенно в первые 2 ч [3, 11].

Повышение за аналогичный период специфического свечения в эпителиоцитах ПК после введения GFP в вену или кишку в обоих случаях происходило со сходной закономерностью, позволяя косвенно оценить количество GFP, поступившего в кровь из кишки. Исходя из установленной зависимости, увеличение на порядок количества

введенного в кровь GFP соответствует повышению флюоресценции на величину около 1,2 усл. ед., а разница в величине флюоресценции при введении GFP в кровь и кишку в одинаковых дозах составляет 1,5–1,8 усл. ед. Следовательно, количество GFP, реабсорбированного в почке после всасывания из кишки, на 1,5–2 порядка меньше, чем при внутривенном введении, и в данных условиях из кишки всасывалось не более сотых долей введенного GFP. Согласно другим расчетам, всасывание в кишечнике различных белков *in vivo* и *in vitro* значительно меньше — от  $10^{-6}$  до  $10^{-4}$  [15, 17, 20]. В то же время в исследованиях абсорбции трипсина в условиях перфузии петли тощей кишки у крыс и морских свинок установлено, что при поддержании концентрации белка в полости кишки 120 мкг/мл его концентрация в вене брыжейки за 45 мин увеличивалась до 1,8 мкг/мл [6], т. е. количество всосавшегося за это время белка составило 1,5%, что сопоставимо с предполагаемым для GFP. Следует, однако, иметь в виду, что эффективность всасывания белковых макромолекул в кишке может зависеть не только от скорости их гидролиза, но также от типа белка и механизмов абсорбции.

Увеличение специфической флюоресценции в эпителиоцитах ПК почки крысы с повышением дозы введенного GFP свидетельствует об усилении захвата этого белка из канальцевой жидкости и его накоплении во внутриклеточных компартментах эпителиоцитов. Увеличение свечения наиболее выражено в цитоплазматических образованиях округлой формы, диаметром 0,5–2 мкм, которые могут являться крупными эндосомами и/или лизосомами. Основанием для такого заключения служат исследования, в которых после введения в пищеварительный тракт малых количеств GFP методами электронной микроскопии и иммуноцитохимии выявлена локализация этого белка в эндосомах и лизосомах эпителиоцитов ПК [11]. Изменение характера флюоресценции может быть обусловлено тем, что реабсорбированный GFP, подобно другим белкам, распределяется в цитоплазме в составе мелких пузырьков, при увеличении количества инъецированного GFP число содержащих его эндосом, по-видимому, возрастает, формируются более крупные эндосомы и лизосомы. В результате в клетке выявляются пузырьки с наиболее высоким уровнем флюоресценции, что прямо указывает на процесс накопления в них GFP. Об этом же свидетельствуют графические корреляты наличия и числа светящихся гранул, когда распределение свечения в цитоплазме клеток становится более дискретным и, в конечном итоге, бимодальным.

Замечено, что интенсивно флюоресцирующие гранулы присутствовали не во всех ПК (см. рис. 1, е), а их количество в клетках отдельных ПК существенно варьировало. Из результатов

пространственной реконструкции ПК почки крыс [4] и мышей [18] следует, что в плоскость среза могут попадать как различные сегменты извитой и прямой частей одного ПК, так и отдельные части ПК, отходящих от почечных телец разных слоев коры. Показано, что у крысы длина сегмента, в котором происходит реабсорбция белка, сходна для низких и высоких доз использованных белков и составляет около  $2/3$  длины извитого ПК, но захват профильтровавшегося белка существенно падает по ходу ПК [4]. По-видимому, эпителиоциты с наиболее выраженным свечением GFP, локализованным в крупных пузырьках, принадлежат начальным сегментам извитой части ПК.

Установленная зависимость величины специфической флюоресценции в эпителиоцитах ПК от дозы GFP, введенного в вену или тонкую кишку, свидетельствует о повышении захвата этого чужеродного белка клетками ПК при увеличении его поступления в кровь. Изменения характера и интенсивности флюоресценции GFP в эпителиоцитах ПК, подтверждаемые графическим анализом распределения свечения, указывают на то, что процесс аккумуляции GFP характеризуется существенным увеличением его количества в отдельных внутрисклеточных компартментах.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Бурмакин М.В., Селивёрстова Е.В. и Наточин Ю.В. Накопление жёлтого флюоресцентного белка в почке после его всасывания в кишечнике крыс. Рос. физиол. журн., 2005, т. 91, № 10, с. 1195–1204.
- Бурмакин М.В., Селивёрстова Е.В. и Наточин Ю.В. Динамика всасывания в кишке и реабсорбции в почке жёлтого флюоресцентного белка у крыс в постнатальном онтогенезе. Журн. эвол. биохим., 2007, т. 43, № 2, с. 187–193.
- Селивёрстова Е.В., Бурмакин М.В., Шахматова Е.И. и др. Аккумуляция в почке экзогенного белка после его всасывания в кишечнике при развитии экспериментальной почечной недостаточности у крыс. Нефрология, 2007, т. 11, № 1, с. 7–15.
- Baran D., Tendstad O. and Aukland K. Localization of tubular uptake segment of filtered cystatin C and aprotinin in the rat kidney. Acta Physiol., 2006, v. 186, p. 209–221.
- Berlin M.C., Li H. and Sperber K. Antibody-mediated antigen sampling across intestinal epithelial barriers. Ann. N. Y. Acad. Sci., 2006, v. 1072, p. 253–261.
- Borges E.L., Petroianu A., Barbosa A.J. et al. Jejunal absorption of trypsin in rat and guinea pig. Braz. J. Med. Biol. Res., 1995, v. 28, № 1, p. 65–73.
- Cloutier M., Gingras D. and Bendayan M. Internalization and transcytosis of pancreatic enzymes by the intestinal mucosa. J. Histochem. Cytochem., 2006, v. 54, № 7, p. 781–794.
- Cococel C., Maita K., Baumann K. and Hook J.B. Renal processing of low molecular weight proteins. Pflügers Arch., 1984, v. 401, № 4, p. 333–339.
- Cramer A., Whitehorn E.A., Tate E. and Stemmer W.P. Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling. Nat. Biotechnol., 1996, v. 14, p. 315–319.
- Hysing J. and Tolleshaug H. Quantitative aspects of the uptake and degradation of lysozyme in the rat kidney in vivo. Biochim. Biophys. Acta, 1986, v. 887, № 1, p. 42–50.
- Seliverstova E.V., Burmakina M.V. and Natochin Yu.V. Renal clearance of absorbed intact GFP in the frog and rat intestine. Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol., 2007, v. 147, № 4, p. 1067–1073.
- Takano M., Koyama Y., Nishikawa H. et al. Segment-selective absorption of lysozyme in the intestine. Eur. J. Pharmacol., 2004, v. 502, № 1–2, p. 149–155.
- Tenstad O., Roald A.B., Grubb A. and Aukland K. Renal handling of radiolabelled human Cystatin C in the rat. Scand. J. Clin. Lab. Invest., 1996, v. 56, № 5 p. 409–414.
- Tsien R.Y. The green fluorescent protein. Annu. Rev. Biochem., 1998, v. 67, p. 509–544.
- Udall J.N., Colony P., Fritze L. et al. Development of gastrointestinal mucosal barrier. II. The effect of natural versus artificial feeding on intestinal permeability to macromolecules. Pediatr Res., 1981, v. 15, № 3, p. 245–259.
- Verkusha V.V., Kuznetsova I.M., Stepanenko O.V. et al. High stability of Discosoma DsRed as compared to Aequorea EGFP. Biochemistry, 2003, v. 42, № 26, p. 7879–7884.
- Walker W.A. and Bloch K.J. Intestinal uptake of macromolecules in vitro and in vivo studies. Ann. N.Y. Acad. Sci., 1983, v. 409, p. 593–602.
- Zhai X.Y., Birn H., Jensen K.B. et al. Digital three-dimensional reconstruction and ultrastructure of the mouse proximal tubule. J. Am. Soc. Nephrol., 2003, v. 14, № 3, p. 611–619.
- Ziv E. and Bendayan M. Intestinal absorption of peptides through the enterocytes. Microscop. Res. Techniq., 2000, v. 49, № 4, p. 346–352.
- Ziv E., Lior O. and Kidron M. Absorption of protein via the intestinal wall. A quantitative model. Biochem. Pharmacol., 1987, v. 36, № 7, p. 1035–1039.

Поступила в редакцию 18.11.08

### GREEN FLUORESCENT PROTEIN ABSORPTION AND ACCUMULATION IN THE CELLS OF RENAL PROXIMAL TUBULES AFTER ITS INCREASED ENTRY INTO CIRCULATION

*N.P. Prutskova and Ye.V. Seliverstova*

The uptake of green fluorescent protein (GFP) by the proximal renal tubules was studied in the anaesthetized rats using laser confocal microscopy after GFP intravenous injection or administration into the small intestine lumen. The specific green fluorescence revealed in the proximal tubule cells after intravenous injection correlated with the logarithm of GFP dose injected intravenously ( $r=0.96$ ,  $p<0.05$ ). GFP fluorescence after its intravenous injection was higher than that one after GFP infusion into the small intestine ( $p<0.05$ ). Following the increase of injected GFP dose, the epitheliocyte cytoplasm, in addition to diffuse fluorescence, demonstrated large intensely fluorescent vesicles, that was confirmed by a graphical analysis. The reported changes in the intensity and pattern of specific fluorescence indicate the enhancement of GFP absorption by the cells of proximal tubules and GFP accumulation in the intracellular compartments during its increased entry into circulation.

**Key words:** kidney, proximal tubule, small intestine, green fluorescent protein (GFP), confocal microscopy.

Laboratory of Renal Physiology and Water and Salt Metabolism, I.M. Sechenov RAS Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, St. Petersburg.