

УДК 576.08:577.352.45

РОЛЬ КАЛЬЦИЕВЫХ КАНАЛОВ В РЕГУЛЯЦИИ ПОГЛОЩЕНИЯ ГЛЮКОЗЫ В КЛЕТОЧНОЙ *IN VITRO* МОДЕЛИ ПОЛЯРИЗОВАННОГО КИШЕЧНОГО ЭПИТЕЛИЯ

© 2024 г. Д. Е. Бобков¹, А. В. Лукачева¹, Л. В. Кевер¹, В. В. Фурман¹, С. Б. Семенова¹, *¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064, Россия

* E-mail: svsem@incras.ru

Поступила в редакцию 29.09.2023 г.

После доработки 25.10.2023 г.

Принята к публикации 27.10.2023 г.

Глюкоза является основным энергетическим субстратом, обеспечивающим метаболические процессы в организме человека и животных. Нарушение метаболизма углеводов часто ассоциировано с ожирением и сопутствующими заболеваниями, такими как сердечно-сосудистые заболевания, артериальная гипертензия, инсулинорезистентность и др. Современные данные указывают на сопряжение всасывания глюкозы в кишечнике со входом Ca^{2+} , однако для подтверждения такого взаимодействия необходимы дополнительные исследования. Мы использовали клеточную *in vitro* модель кишечного эпителия человека для выяснения роли Ca^{2+} -каналов в регуляции всасывания глюкозы. Результаты иммунофлуоресцентной и иммуноэлектронной микроскопии показали, что высокая нагрузка клеток глюкозой (50 мМ) приводит к увеличению плотности кальциевых каналов TRPV6 на апикальной мембране кишечного эпителия. Уровень кальциевого сенсора STIM1, ответственного за депо-зависимый вход кальция (SOCE), напротив, демонстрировал снижение при избыточной нагрузке клеток эпителия глюкозой, которое сопровождалось уменьшением SOCE. Кроме того, инкубация клеток кишечного эпителия в растворе с высокой концентрацией глюкозы приводила к подавлению образования субъединицы р65 транскрипционного фактора NF- κ B, ответственной за экспрессию STIM1. Полученные данные показали, что Ca^{2+} -каналы не только участвуют в регуляции поглощения глюкозы, но и сами могут находиться под контролем глюкозы.

Ключевые слова: клетка, кишечный эпителий, вход кальция, кальциевый канал TRPV6, глюкоза, транспортер GLUT2

Принятые сокращения: $[\text{Ca}^{2+}]_i$ – внутриклеточная концентрация кальция; FID – FITC-dextran (fluorescein isothiocyanate dextran); ORAI1 – каналы депо-зависимого входа кальция; PBS – фосфатно-солевой буферный раствор; SGLT1 и GLUT2 – транспортеры глюкозы; SOCE – депо-управляемый вход кальция (store-operated calcium entry); STIM1 – сенсор кальция в ЭПР; TEER – трансэпителиальное/трансэндотелиальное электрическое сопротивление.

DOI: 10.31857/S0041377124020051, **EDN:** RKFSBW

Кишечный эпителий выполняет множество функций в организме: он служит барьером на пути различных факторов из окружающей среды, обеспечивает транспорт воды и электролитов, а также осуществляет всасывание и переваривание питательных веществ. Сложные углеводы, попадая в тонкий кишечник, сперва гидролизуются до моносахаридов, таких как глюкоза или галактоза, а затем транспортируются через слизистую оболочку кишечника. Поглощение избыточного количества глюкозы в тонком кишечнике сопряжено с развитием ожирения, диабета и сопутствующих тяжелых заболеваний. Терапевтические подходы к лечению таких заболеваний требуют определения четких механизмов регуляции абсорбции глюкозы, которые пока не установлены.

Классический путь абсорбции глюкозы проходит через щеточную мембрану кишечника и преимущественно опосредован мембранным белком-транспортером глюкозы SGLT1, который связывает две молекулы Na^+ вместе с одной молекулой глюкозы (Alexander, Carey, 2001; Gorboulev et al., 2012). Выход глюкозы с базолатеральной поверхности энтероцитов осуществляется транспортером глюкозы GLUT2, который помогает глюкозе перемещаться из энтероцитов во внеклеточную среду возле кровеносных капилляров (Röder et al., 2014). Любой фактор, меняющий активность SGLT1 и GLUT2, также влияет на абсорбцию и метаболизм глюкозы.

В настоящее время предложена модель регуляции кишечной абсорбции глюкозы, в основе

модели лежит изменение уровня внутриклеточной концентрацией кальция $[Ca^{2+}]_i$. Согласно этой модели, при низкой концентрации глюкозы в просвете кишечника всасывание глюкозы осуществляется с помощью SGLT1. Однако когда уровень глюкозы в просвете кишечника становится выше, чем транспортная способность SGLT1, другой переносчик GLUT2, находящийся на базальной мембране клеток, перемещается и встраивается в апикальную мембрану, где начинает участвовать в транспорте глюкозы (Helliwell et al., 2003).

Эти процессы регулируются $[Ca^{2+}]_i$, который модулирует также и экспрессию GLUT2 в энтероцитах (Tharabenjasin et al., 2014; Kuhre et al., 2017). Предварительные результаты свидетельствуют, что транслокация GLUT2 из внутриклеточного пула запускается SGLT1-зависимой активацией протеинкиназы C и MAP-киназы, от которых зависит рост $[Ca^{2+}]_i$ (Helliwell et al., 2003). Увеличение $[Ca^{2+}]_i$ активирует кальмодулин-зависимую киназу легкой цепи миозина (MLCK), дополнительно активируя миозин II путем фосфорилирования регуляторной легкой цепи (RLC20) по Ser19. Эти процессы приводят к перестройке актинового цитоскелета и в итоге — к транслокации GLUT2 к апикальной мембране клетки (Mace, 2007; Bourzac, 2013). Таким образом, транслокация GLUT2 из цитоплазматических пузырьков в апикальную мембрану существенно увеличивает способность энтероцита поглощать глюкозу (Affleck et al., 2003; Zheng et al., 2012; Грефнер, 2014).

Вход Ca^{2+} через мембраны щеточной каймы энтероцитов в основном осуществляется с помощью эпителиальных Ca^{2+} -каналов TRPV6 (transient receptor potential channels vanilloid type 6), которые были впервые клонированы из эпителиальных клеток тонкого кишечника крысы (Peng et al., 1999). Позднее эти каналы были идентифицированы в клетках других млекопитающих и человека (Nijenhuis et al., 2003).

Каналы TRPV6 могут обеспечивать строго дозированное поступление Ca^{2+} и участвовать в активной (ре)абсорбции Ca^{2+} в эпителиальных клетках почек, тонкого кишечника и плаценты (Hoenderop 2002; Nijenhuis et al., 2003). Согласно ряду сообщений, рост $[Ca^{2+}]_i$ в энтероцитах может также контролироваться потенциал-управляемыми Ca^{2+} -каналами L-типа (например, Cav1.3) (Mace et al., 2007) и депо-активируемыми каналами SOCE (Chung et al., 2015). Немаловажную

роль в кальциевом гомеостазе кишечника играет также Ca^{2+} -чувствительный рецептор (Brown, 2013), который является членом суперсемейства G-белок-сопряженных рецепторов (GPCR) и экспрессируется во всей пищеварительной системе (Diaz et al., 1997).

Следует особо отметить, что, хотя спектр Ca^{2+} -проводящих каналов в энтероцитах довольно хорошо охарактеризован, какие именно каналы участвуют в регуляции всасывания глюкозы в кишечнике, до сих пор не установлено.

Задача нашей работы заключалась в определении роли Ca^{2+} -каналов в регуляции всасывания глюкозы. Для этого мы использовали поляризованный монослой клеток Caco-2 в качестве модели кишечного эпителия. С помощью этого подхода было показано увеличение уровня TRPV6 и снижение уровня STIM1, а также уменьшение депо-зависимого входа кальция в энтероциты в условиях высокой нагрузки клеток глюкозой. Полученные данные указывают на сложное реципрокное взаимодействие двух различных кальциевых путей при поглощении глюкозы клетками кишечного эпителия и на важную роль глюкозы в регуляции этого взаимодействия.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Клетки. Использовали клетки аденокарциномы толстой кишки человека (линия Caco-2), полученные из ЦКП “Коллекция культур клеток позвоночных” Института цитологии РАН (Санкт-Петербург). Клетки культивировали при 37 °C и 5% CO_2 в среде DMEM, содержащей 4,5 г/л глюкозы, 15% эмбриональной телячьей сыворотки и 0.008% гентамицина. Для спонтанной дифференцировки в энтероцитоподобный монослой клетки Caco-2 снимали с подложки путем добавления раствора трипсина-версена (0.25 и 0.75% соответственно) и высевали на специальные вставки с полупроницаемой мембраной (размер пор 0.4 мкм), помещенные в многолуночные планшеты (Cell culture insert system; Biofil, Китай). Монослой выращивали в течение 18–21 сут в культуральной среде, при 37 °C и 5% CO_2 . Культуральную среду при выращивании клеток меняли через день. Такой подход позволил создать клеточную объемную (3D) модель поляризованного кишечного эпителия.

Для выяснения влияния уровня глюкозы клетки инкубировали в течение 60 мин в солевой среде, содержащей (мМ): 137 NaCl, 4.7 KCl, 1.2 KH_2PO_4 , 1.2 $MgSO_4$, 2.5 $CaCl_2$, 10 HEPES (pH 7.2),

в которую добавляли глюкозу в низкой (2.5, 5 мМ) или высокой концентрации (25, 50 мМ).

Трансэпителиальное/трансэндотелиальное электрическое сопротивление (TEER) измеряли с использованием эпителиального вольтметра EVOM² (WPI Inc., США), снабженного двумя электродами Ag-AgCl. Для этого один электрод погружали в культуральную среду внутри вставки с клеточным монослоем, а другой размещали в среде снаружи от фильтра (в лунке планшета). Держатель электрода позволял контролировать одинаковый уровень погружения пары электродов. Сопротивление слоя клеток TEER рассчитывали по формуле $TEER = RM$, где R — измеренное сопротивление, из которого вычли сопротивление пустой вставки; M — площадь полупроницаемой мембраны (см²).

Измерение проницаемости слоя с использованием FID (FITC-dextran). Клетки во вставках дважды отмывали раствором Хенкса с 10 мМ HEPES (HBSS-H), далее в базолатеральный отсек вносили 700 мкл HBSS-H, а в апикальный отсек к клеткам вносили 125 мкл раствора FID в концентрации 1 мг/мл в HBSS-H. Затем планшеты помещали в CO₂-инкубатор при 37 °C и каждые 30 мин из нижнего отсека забирали по 100 мкл раствора, восстанавливая прежний объем добавлением 100 мкл свежего HBSS-H.

Образцы собирали и измеряли флуоресцентный сигнал отобранных аликвот с использованием планшетного мультимодального ридера Varioskan LUX (Thermo Scientific, США) при длинах волн возбуждения и испускания соответственно 490 и 520 нм. Коэффициент проницаемости Papp рассчитывали по формуле $Papp = dQ/dt/C_0A$, где dQ/dt — поток вещества, мкг/с; C_0 — начальная концентрация в донорном отсеке, мкг/мл; A — площадь пористой поверхности вставки, см² (Westerhout et al., 2014).

Для вычисления значений dQ/dt измеряли концентрацию FID в базолатеральном отсеке через 30, 90 и 150 мин после добавления FID в апикальный отсек, а затем строили линейную регрессию концентрации в зависимости от времени. Если полученное уравнение линейной регрессии было статистически значимым ($P < 0.1$), коэффициент наклона Slope считали равным dQ/dt .

Иммуноэлектронная микроскопия выполнена на участках поляризованного эпителия, которые фиксировали в растворе 2%-ного параформальдегида и 0.5%-ного глутаральдегида в PBS в течение 1 ч, затем обезвоживали в спиртах и заливали в акриловую смолу LR-White (Merck, Германия). Потом

участки эпителия изолировали из культуральных вставок и использовали для приготовления ультратонких срезов, которые помещали на никелевые сетки, покрытые формваровой пленкой. Для иммуноокрашивания сетки выдерживали 20 мин в 1%-ном бычьем сывороточном альбумине, а затем инкубировали 1 ч с первичными анти-TRPV6 антителами (в разведении 1:100) и вторичными антителами, конъюгированными с коллоидным золотом размером 10 нм (1:50).

Контролем служили срезы без обработки первыми антителами. Ультратонкие срезы клеток после обработки контрастировали уранил-ацетатом и цитратом свинца и анализировали на электронном микроскопе Libra-120 (Carl Zeiss, Германия).

Иммунофлуоресцентный анализ. Изолированные из культуральных вставок участки кишечного эпителия фиксировали в 3.7%-ном параформальдегиде, пермеабилizовали в присутствии 0.25%-ного Tween 20 и инкубировали с первичными антителами при 4 °C в течение ночи. После отмывки клетки инкубировали с вторичными антителами (1:200) в течение 40 мин при 37 °C.

Для визуализации актинового цитоскелета и клеточных ядер клетки окрашивали родамин-фаллоидином и красителем DAPI соответственно. Далее участки эпителия помещали апикальной стороной на покровные стекла, добавляли среду Vectashield mounting medium (Vector Laboratories, США) и исследовали с помощью конфокального микроскопа Olympus FV3000 (Olympus Corporation, Япония), используя масляный объектив 40×. Интенсивность флуоресценции оценивали с помощью ImageJ (NIH, США) и усредняли по меньшей мере для 5–10 образцов в каждом эксперименте.

Интенсивность флуоресценции в клетках после их инкубации в растворах с глюкозой сравнивали с помощью t -критерия Стьюдента. Данные представлены как среднее значение и его ошибка (SEM). Для определения различий использовали U -критерий Манна–Уитни, различия считали достоверными при уровне значимости $P < 0.05$.

Вестерн-блот-анализ. Клетки промывали теплым раствором PBS и лизировали в лизирующем буфере (100 мМ NaF, 50 мМ KCl, 2 мМ MgCl₂, 1 мМ EGTA, 1 М сахарозы, 1% Triton X-100, 100 мкМ PMSF, 10 мМ К-фосфатного буфера pH 7.0) 10 мин на льду. Полученные лизаты клеток центрифугировали при 2000 g, супернатант собирали и определяли концентрацию белка по методу Бредфорда с помощью прибора NanoDrop One (Thermo Scientific, США).

Электрофоретическое разделение белков проводили методом диск-электрофореза с последующим переносом на нитроцеллюлозную мембрану. Ее инкубировали с первичными антителами против исследуемых белков, а затем — с вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена (HRP). Визуализацию конъюгированных с HRP антител осуществляли путем усиленной хемилюминесценции. Хемилюминесцентное свечение регистрировали с помощью системы SuperSignal Substrate (Thermo Fisher Scientific, США).

Измерение $[Ca^{2+}]_i$. Использовали флуоресцентный кальций-чувствительный зонд Fluo-4 (Molecular Probes, США). Изображения клеток получали с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа Olympus FV3000 (Olympus Corporation, Япония), используя объектив 40× с масляной иммерсией. Интенсивность флуоресценции оценивали с помощью программы ImageJ (NIH, США).

Визуализация актинового цитоскелета. Клетки окрашивали родамин-фаллоидином (Invitrogen, США) в течение 20 мин, ядра окрашивали красителями DAPI (0.05 мкг/мл) или Hoechst 33342 (1.5 мкг/мл).

Антитела. Использовали коммерческие антитела различных производителей: кроличьи, выработанные против TRPV6 (Santa Cruz Biotech, США, или Alomone, Израиль) в разведении 1:100; против STIM1 (Alomone, Израиль) в разведении 1:1000; против ORAI1 (Alomone, Израиль) в разведении 1:200; против p65 (Thermo Fisher Scientific, Великобритания) в разведении 1:1000 и против GLUT2 (Thermo Fisher Scientific, Великобритания) в разведении 1:200. В качестве вторичных антител использовали конъюгаты Alexa Fluor 488 (Invitrogen, США), GAR-FITC (Jackson, США) и GAM-Cy3 (Jackson, США) в разведении 1:200. Для иммуноэлектронной микроскопии в качестве вторичных антител использовали антикроличьи иммуноглобулины (Sigma, США), конъюгированные с коллоидным золотом (размер частиц 10 нм). Для иммуноблота использовали антикроличьи или антимышинные вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (Sigma, США). Антитела разводили в PBS, pH 7.4.

РЕЗУЛЬТАТЫ

На протяжении многих лет трансмембранный перенос веществ изучали, как правило, на изолированных препаратах тонкой кишки или в усло-

виях острого (или хронического) опыта на анестезированных животных. Однако такие условия часто вносили изменения в процессы всасывания веществ и работу различных транспортеров. Более того, поглощение веществ в кишечнике грызунов и человека сильно различается. Поэтому в последнее время в качестве модели для изучения процессов всасывания в тонком кишечнике используют клетки аденокарциномы человека линии Caco-2, которые при длительном культивировании могут поляризоваться и формировать микроворсинки на апикальной поверхности эпителия (Blais et al., 1987).

Мы исследовали роль кальциевых каналов в поглощении глюкозы, используя дифференцированный монослой клеток Caco-2 как клеточную модель кишечного эпителия. После 18–21 сут культивирования клеток Caco-2 на полупроницаемых мембранах (метод transwell assay) исследовали степень дифференцировки и поляризованности монослоя эпителия. Целостность плотных соединений в модели клеточной культуры эпителиального монослоя оценивали путем измерения сопротивления TEER. Этот метод оценки целостности и проницаемости монослоя использовали для мониторинга живых клеток на различных стадиях их роста и дифференцировки (рис. 1). Клетки использовали для проведения эксперимента при достижении значений сопротивления монослоя 400–600 Ом·см².

С помощью электронного микроскопа оценивали фенотип клеток эпителия для проверки их морфологического и функционального соответствия энтероцитам, выстилающим тонкий кишечник. Рис. 2 демонстрирует изображения клеток эпителиального монослоя, на апикальной поверхности которого присутствуют микроворсинки, а

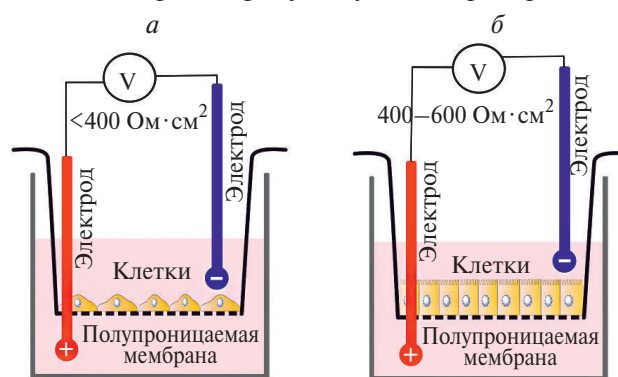


Рис. 1. Схема, демонстрирующая культуральную вставку с клетками на полупроницаемой мембране. Вставка расположена в лунке пластикового планшета для культивирования клеток.

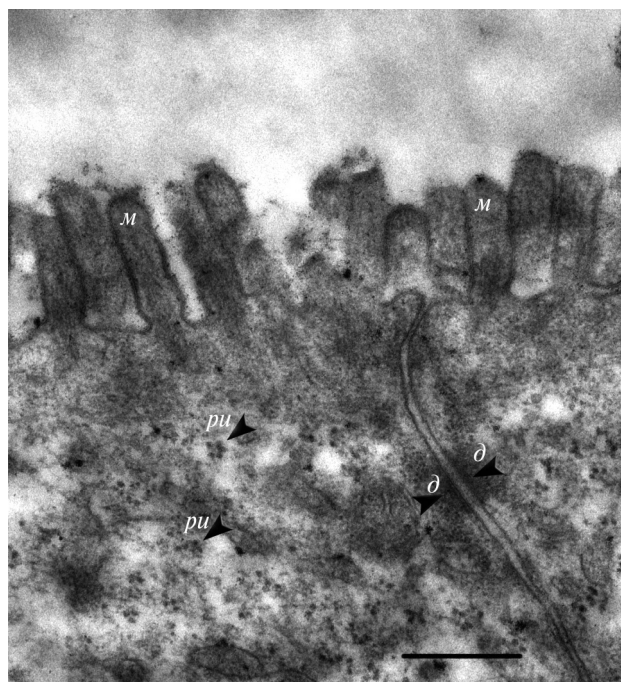


Рис. 2. Ультратонкий срез двух соседних клеток эпителия в области межклеточных контактов. Видны корневые нити микроворсинок, межклеточные контакты, митохондрии и мембраны эндоплазматического ретикулума. Контрольный препарат. Стрелками указаны микроворсинки (*м*), десмосомы (*д*) в местах межклеточных контактов и рибосомы (*ри*) на поверхности эндоплазматического ретикулума. Масштабная линейка: 400 нм.

между клетками видны хорошо сформированные щелевые контакты, что в целом отражает степень поляризации кишечного эпителия. В цитоплазме клеток выявлены все присущие большинству энтероцитов органоиды, включая митохондрии, элементы цитоскелета, эндоплазматический ретикулум с рибосомами и др. По всей длине микроворсинок присутствуют пучки микрофиламентов, переходящие в области терминальной сети в корневые нити.

Присутствие хорошо сформированного актинового цитоскелета в микроворсинках на апикальной поверхности клеток было подтверждено также флуоресцентным окрашиванием с помощью родамин-фаллоидина (рис. 3). Анализ 3D-изображений, реконструированных из серии оптических срезов X–Y, полученных с помощью сканирующего лазерного конфокального микроскопа, подтвердил формирование поляризованного эпителия с присутствием микроворсинок и формированием сверхплотных контактов между клетками кишечного эпителия.

Способность монослоя поглощать глюкозу оценивали с помощью полисахарида декстрана,

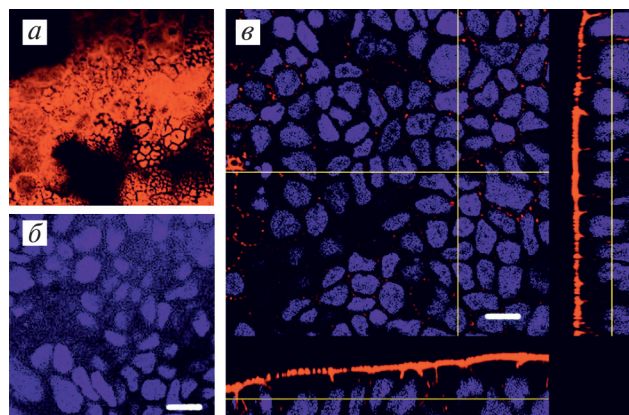


Рис. 3. Модель поляризованного эпителия кишечника, сформированная клетками Сасо-2 на полупроницаемых мембранах в культуральной среде. Срезы в направлении X–Y (*а*, *б*) и Y–Z (*в*). Окраска родамин-фаллоидином (красный) демонстрирует богатые актином микроворсинки на апикальной поверхности клеток, окраска ядер DAPI (синий) свидетельствует о разделении клеток на апикальную и базальную области. Контрольный препарат. Масштабная линейка: 10 мкм.

конъюгированного с флуоресцентным зондом FID. Оценку проводили с помощью планшетного полимодального ридера в двух независимых экспериментах, в каждом из которых определяли коэффициент проницаемости *P_{app}*.

Проведенный анализ показал постепенное нарастание флуоресцентного сигнала с течением времени. Полученный коэффициент проницаемости, равный $(76 \pm 19) \cdot 10^{-6}$ см/с, соответствует высокой предсказанной гастроинтестинальной абсорбции *in vivo* (Yee, 1997) и согласуется со значением *P_{app}* для D-глюкозы, равным $(17–20) \cdot 10^{-6}$ см/с для клеток Сасо-2 (Westerhout et al., 2014).

Для оценки роли кальциевых каналов в транспорте глюкозы мы провели иммунофлуоресцентный анализ пространственного распределения кальциевых каналов TRPV6 и глюкозного транспортера GLUT2 в условиях низкой (5 мМ) и высокой (50 мМ) нагрузки клеток глюкозой. Значения концентраций и время инкубации с глюкозой были выбраны согласно данным работы (Грефнер и др., 2010), в которой концентрация глюкозы в клетках Сасо-2 измерена глюкозооксидазным методом.

Интенсивность флуоресценции GLUT2 анализировали в апикальных и базальных областях с помощью сканирования в направлении осей X–Y и Y–Z. Было установлено, что глюкозный транспортер GLUT2 (рис. 4*а*, *б*) локализуется в цитоплазме клеток кишечного эпителия. Численное значение средней интенсивности флуоресценции

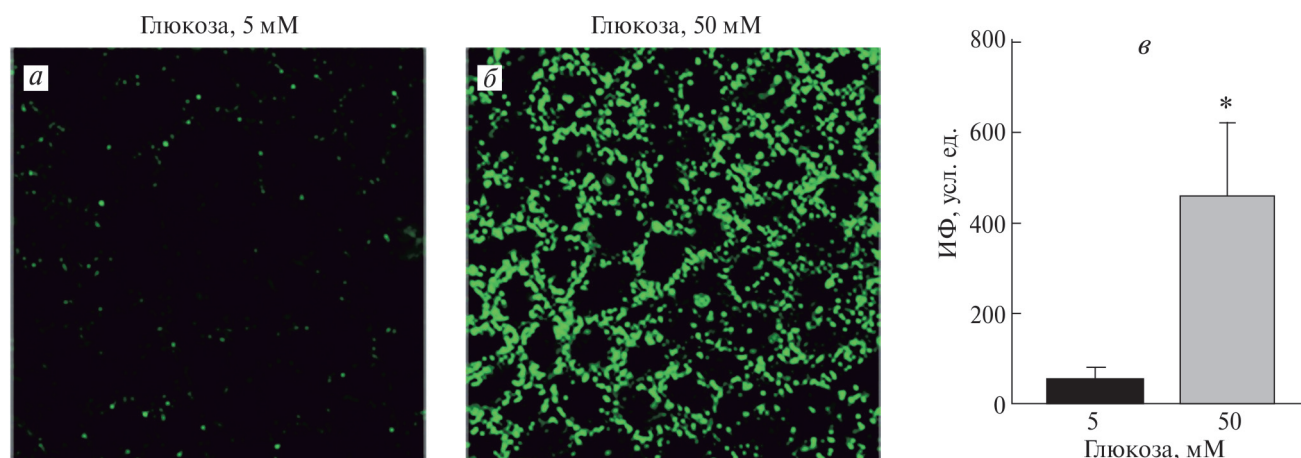


Рис. 4. Поляризованный эпителий кишечника, сформированный клетками Сасо-2 в условиях 3D-культивирования. Срез на уровне середины клетки в направлении X–Y (*а*, *б*). Окраска антителами против транспортера глюкозы GLUT2 (зеленый цвет) демонстрирует более высокую его концентрацию при нагрузке клеток 50 мМ глюкозы; масштабная линейка: 10 мкм; *в* – интенсивность флуоресценции (ИФ) GLUT2 в клетках, инкубированных в присутствии 5 мМ или 50 мМ глюкозы. Вертикальные отрезки – ошибки среднего значения, различия достоверны (*) при $P < 0.05$.

клеток на каждом выбранном уровне сканирования получали с помощью программы ImageJ.

Показано, что иммунореактивность, выявленная с помощью FITC-конъюгированных вторичных антител, существенно увеличивалась при нагрузке клеток 50 мМ глюкозы. Результаты, представленные на рис. 4, демонстрируют, что после инкубации клеток как с 50 мМ, так и с 5 мМ глюкозы распределение сигнала от глюкозного транспортера GLUT2 находится ближе к центральной области поляризованных клеток, а не в ее апикальной или базальной части. Соответственно, у нас нет оснований полагать, что избыточная нагрузка клеток углеводами приводит к перемещению GLUT2 с базальной мембраны и встраиванию в апикальную мембрану (Kellett, 2001).

Анализ иммунофлуоресцентных изображений эпителия, окрашенного антителами против TRPV6, выявил, что уровень сигнала гораздо выше в клетках эпителия, которые испытывали нагрузку 50 мМ глюкозы, чем в клетках с нагрузкой 5 мМ глюкозы. Было замечено, что увеличение флуоресцентного сигнала (и соответственно присутствие каналов TRPV6) наблюдали только на апикальной поверхности мембраны. На уровне базальной мембраны уровень флуоресценции не отличался в клетках, предварительно инкубированных с разными концентрациями глюкозы (рис. 5).

Результаты иммунофлуоресцентного окрашивания получили подтверждение также в экспериментах с использованием иммуоэлектронной микроскопии. Для электронно-микроскопического анализа предварительно инкубированные в соле-

вом растворе клетки (с концентрациями глюкозы 5 или 50 мМ) обрабатывали специфическими антителами против TRPV6 и вторичными антителами, конъюгированными с золотом. Анализ ультратонких срезов эпителия показал значимо большее количество золотых частиц (10 нм), маркирующих каналы TRPV6, на апикальной мембране энтероцито-подобных клеток после их нагрузки 50 мМ, чем после нагрузки 5 мМ глюкозы (рис. 6б).

С помощью вестерн-блот-анализа в Тритон X-100-растворимых фракциях лизатов клеток Сасо-2 обнаружено присутствие белков ORAI1 и STIM1, ответственных за депо-зависимый вход кальция в клетки (рис. 7а). Более того, показано, что уровень кальциевого сенсора, белка STIM1, существенно снижается при нагрузке клеток 25 мМ глюкозы, в то время как белок Orail, формирующий поры, по-видимому, не чувствителен к нагрузке клеток глюкозой. Кроме того, вестерн-блот-анализ выявил, что уровень субъединицы р65 транскрипционного фактора NF- κ B, ответственного за экспрессию STIM1 (Eylenshtein et al., 2012; DebRoy et al., 2014), также падает при увеличении нагрузки клеток 25 мМ глюкозы (рис. 7а).

Измерение уровня внутриклеточного кальция с использованием флуоресцентного кальций-чувствительного зонда Fluo-4 показало увеличение $[Ca^{2+}]_i$ в ответ на действие активатора опустошения кальциевых депо-тапсигаргина, подтверждая тем самым активацию депо-зависимого входа кальция в клетки Сасо-2 (рис. 7б). Важно, что кальциевый ответ на действие тапсигаргина в клетках, инкубированных с 2.5 мМ глюкозы,

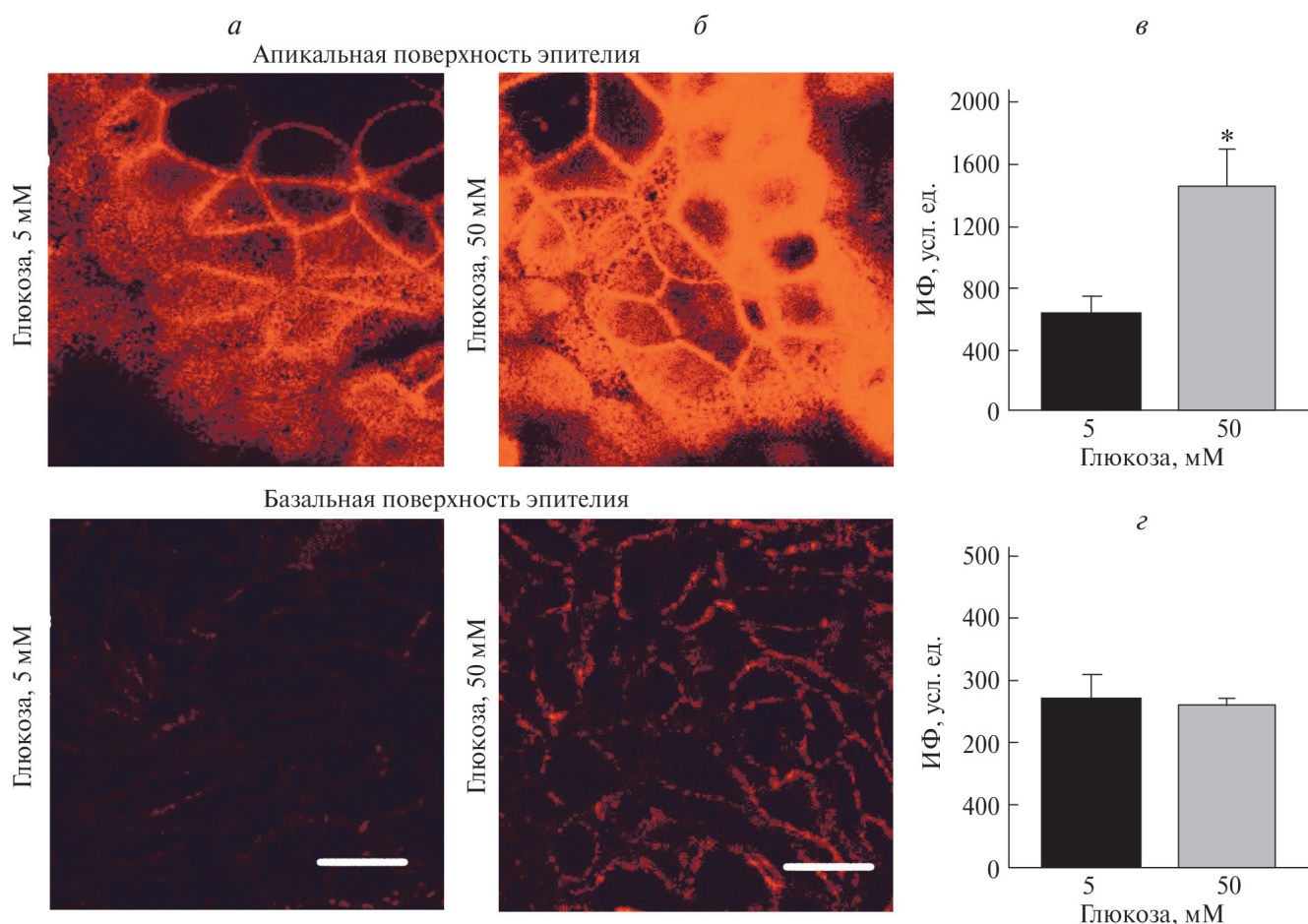


Рис. 5. Поляризованный эпителий кишечника, сформированный клетками Сасо-2. Срез на уровне апикальной (а) и базальной (б) мембраны клеток в направлении X–Y. Окраска антителами против TRPV6 (красный цвет) демонстрирует более высокую концентрацию TRPV6 на апикальной поверхности при нагрузке клеток 50 мМ глюкозы; в, г – интенсивность флуоресценции (ИФ) TRPV6; масштабная линейка: 10 мкм. Вертикальные отрезки – стандартные ошибки среднего значения, различия достоверны (*) при $P < 0.05$.

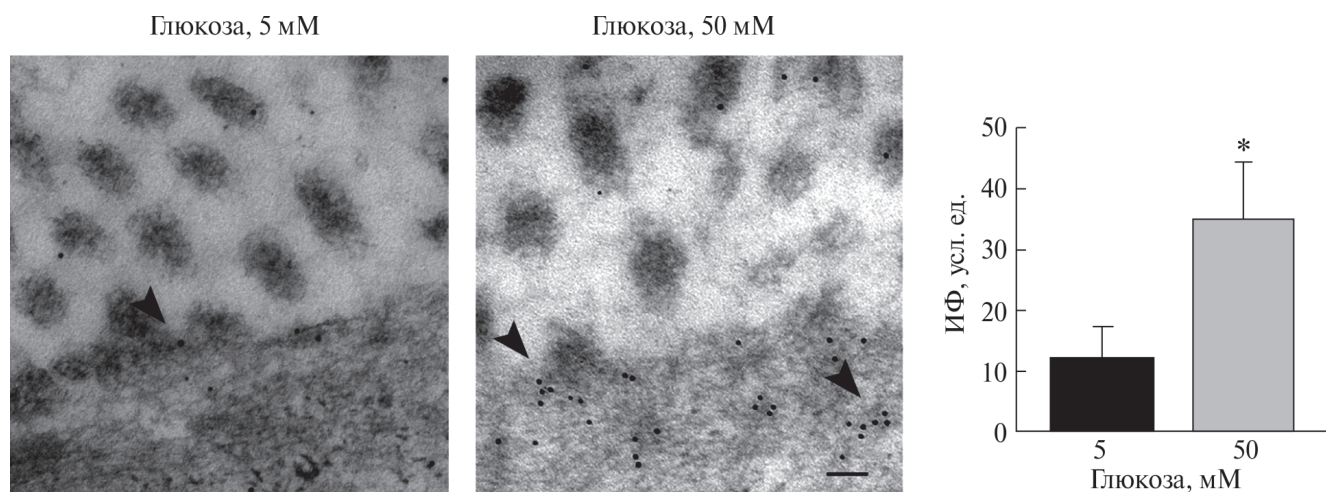


Рис. 6. Локализации каналов TRPV6 в клетках кишечного эпителия в зависимости от нагрузки глюкозой. Иммуноэлектронная микроскопия. Микрофотографии распределения частиц коллоидного золота (10 нм, стрелки), соответствующих каналам TRPV6 в клетках, нагруженных 5 мМ и 50 мМ глюкозы; масштабная линейка: 100 нм; гистограмма показывает численное распределение частиц золота в клетках, инкубированных в присутствии 5 и 50 мМ глюкозы. Показаны средние значения и их ошибки, различия достоверны (*) при $P < 0.05$.

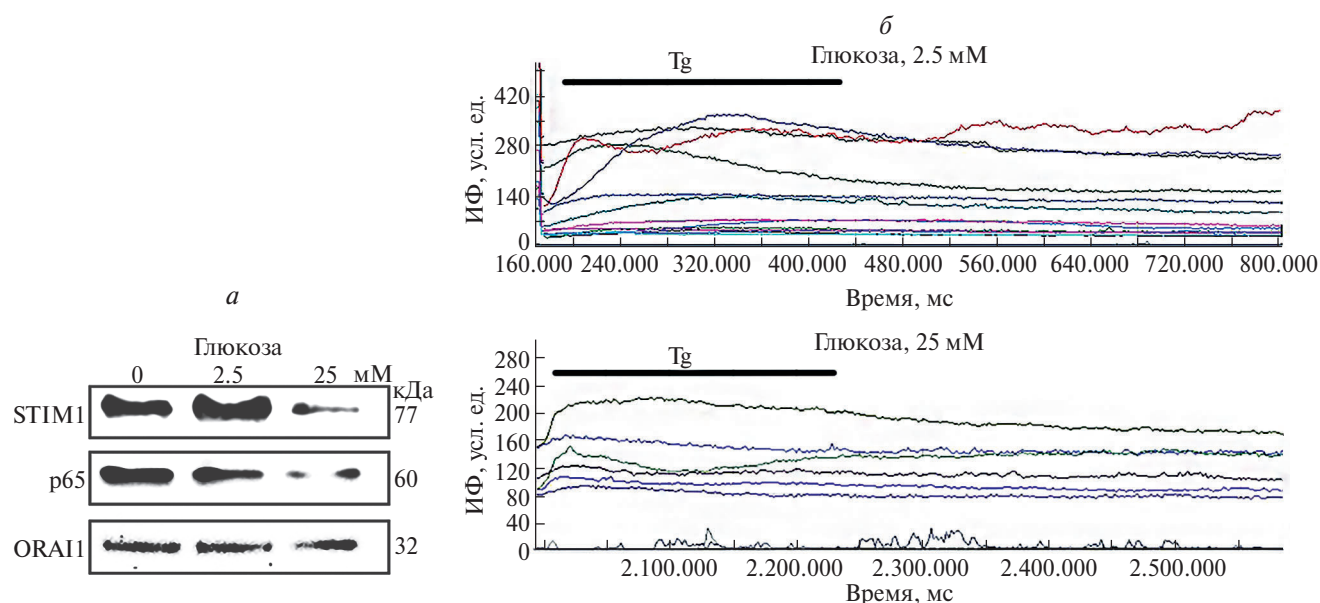


Рис. 7. Влияние глюкозы на депо-зависимый вход кальция в клетки Сасо-2: *а* — Вестерн-блоттинг: влияние различных концентраций глюкозы на содержание белков STIM1, ORAI1 и субъединицы p65 фактора NF-κB в клетках Сасо-2; *б* — более низкий депо-зависимый вход кальция (в ответ на действие тапсигаргина Tg) в клетки Сасо-2 после нагрузки их 25 мМ глюкозы (по сравнению с таковым после нагрузки клеток 2.5 мМ глюкозы). Показана зависимость интенсивности флуоресценции (ИФ) кальций-чувствительного зонда Fluo-4 (ось ОУ) от времени (ось ОХ) по данным прижизненной конфокальной микроскопии. Цветные линии на графиках показывают сигнал от разных клеток, находящихся в одном поле зрения.

был существенно выше, чем в клетках, насыщенных 25 мМ глюкозы (рис. 7б).

ОБСУЖДЕНИЕ

Несмотря на то, что проблеме транспорта глюкозы в кишечном эпителии посвящено много работ, концепции функционального взаимодействия транспортеров глюкозы с катионными каналами только начинают формироваться в научном мире. Так, было показано, что при исключении Ca^{2+} из люминального перфузата при высоких концентрациях глюкозы всасывание глюкозы прекращается (Morgan et al., 2007). Поступающие данные указывают на участие $[\text{Ca}^{2+}]_i$ и кальциевых каналов в работе транспортеров глюкозы SGLT1 и GLUT2, однако детали такого взаимодействия остаются неясными. Отчасти это связано с трудностями проведения экспериментальных измерений в просвете кишечника и капиллярах крови.

Для выяснения роли кальциевых каналов в абсорбции глюкозы мы использовали клеточную *in vitro* модель кишечного эпителия человека, чтобы иметь возможность менять экспериментальные условия и изучать механизмы поглощения глюкозы на участке живой эпителиальной ткани человека (или органа), а не на одиночной клетке.

Наши результаты показали, что количество высокоселективных эпителиальных Ca^{2+} -каналов TRPV6 существенно увеличивается при увеличении нагрузки эпителиальных клеток глюкозой. Следует особенно отметить, что присутствие каналов наблюдается в основном на апикальной поверхности мембраны и не меняется на базальной мембране, что указывает на необходимость присутствия каналов на участке, где происходит абсорбция глюкозы.

В работе было обнаружено, что количество кальциевых сенсоров эндоплазматического ретикула STIM1, отвечающих за другой — депо-зависимый — вход кальция в клетки, напротив, существенно снижался. Эти результаты согласуются с уменьшением входа SOCE в условиях с избыточной нагрузкой глюкозой и указывают на реципрокные взаимодействия между двумя путями входа кальция: через кальциевые каналы TRPV6 и через кальциевый комплекс ORAI1/STIM1. Такой кальциевый баланс критически необходим для нормального функционирования клетки, поскольку избыток кальция, как и его недостаток, может быть губительным для клеток.

Известно, что NF-κB рекрутируется в сайты связывания в промоторах STIM1 и ORAI1 (DebRoy et al., 2014). Полученные результаты вестерн-блот-анализа продемонстрировали, что уровень

p65, который был достаточно высок в клетках Caco-2, существенно снижается при увеличении концентрации глюкозы в среде. Это может свидетельствовать о вероятном влиянии глюкозы на экспрессию STIM1 через регулирование экспрессии транскрипционного фактора NF-κB.

Из литературных источников известно влияние глюкозы на экспрессию многих генов. Например, в ответ на высокий уровень глюкозы изменяется экспрессия генов *RASD1*, *GLRA1*, *VAC14*, *SLCO5A1*, *TMED3*, *SYT16*, *LEPREL2* и *CHRNA5* (Hall et al., 2018), подтверждая тем самым вероятность влияния высокой концентрации глюкозы на прямую или опосредованную экспрессию генов, кодирующих кальциевые каналы.

Фактически глюкоза регулирует пути поступления Ca^{2+} , а Ca^{2+} регулирует всасывание глюкозы. Считается, что высокая концентрация глюкозы деполяризует апикальную мембрану энтероцита в результате активации натрий-глюкозного котранспортера, что приводит к увеличению абсорбции Ca^{2+} . Связывание Ca^{2+} с белком кальбиндином-D9K предотвращает увеличение поглощения Ca^{2+} и стимулирует трансклеточный транспорт, который в принципе направлен на ослабление потенциального увеличения цитозольного Ca^{2+} (Morgan et al., 2007).

Однако исследования поглощения кальция в клетках почек показали, что кинетика связывания Ca^{2+} с кальбиндином-D28K достаточно медленная относительно повышения цитозольного Ca^{2+} (Koster et al., 1995). Поэтому вполне логично предположить, что снижение кальция в клетке при высокой концентрации глюкозы происходит за счет ограничения других путей поступления Ca^{2+} в клетку, например снижения входа SOCE.

В целом интеграция абсорбции глюкозы и поступления Ca^{2+} через кальциевые каналы представляет собой сложную систему реципрокных взаимодействий, которая позволяет быстро и точно сбалансировать пути поступления необходимых ионов и молекул при потреблении пищи.

Следует отметить, что мы не получили данных в пользу гипотезы, предполагающей всасывание глюкозы (особенно в диапазоне ее высоких концентраций) с помощью механизма облегченной диффузии с участием глюкозных транспортеров GLUT2 (Kellett, 2001; Kellett, Helliwell, 2000), которые при высоких углеводных нагрузках могут встраиваться в апикальную мембрану клеток кишечника и транспортировать глюкозу. Для понимания полной картины этого сложного процесса необходимы дополнительные исследования.

БЛАГОДАРНОСТИ

Клеточная линия Caco-2 получена из ЦКП «Коллекция культур клеток позвоночных» Института цитологии РАН (Санкт-Петербург), которая поддерживается Министерством науки и высшего образования РФ (соглашение № 075-15-2021-683).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа финансирована Российским научным фондом (проект № 22-25-00365).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В работе отсутствуют исследования человека или животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 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. Т. 52. С. 580. (Grefner N.M., Gromova L.V., Gruzdkov A.A., Komissarchik Ya.Yu. 2010. Comparative analysis of SGLT1 and GLUT2 transporter distribution in rat small intestine enterocytes and Caco2 cells during hexose absorption. Tsitologiya. V. 52. P. 580.)
- Грефнер Н.М., Громова Л.В., Груздков А.А., Комиссарчик Я.Ю. 2014. Взаимодействие транспортеров глюкозы SGLT1 и GLUT2 и цитоскелета в энтероцитах и клетках Caco2 при транспорте сахаров. Цитология. Т. 56. С. 749–757. (Grefner L.V., Gromova A.A., Gruzdkov, Komissarchik Ya.Yu. 2014. The interaction between SGLT1 or GLUT2 glucose transporter and the cytoskeleton in the enterocyte as well as Caco2 cell during hexose absorption. Tsitologiya. V. 56. P. 749.)
- Affleck J.A., Helliwell P.A., Kellett G.L. 2003. Immunocytochemical detection of GLUT2 at the rat intestinal brush-border membrane. J. Histochem. Cytochem. V. 51. P. 1567.
<https://doi.org/10.1177/002215540305101116>
- Alexander A.N., Carey H.V. 2001. Involvement of PI 3-kinase in IGF-I stimulation of jejunal Na^{+} - K^{+} -ATPase activity and nutrient absorption. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. V. 280. P. G222.
<https://doi.org/10.1152/ajpgi.2001.280.2.G222>
- Blais A., Bissonnette P., Berteloot A. Common characteristics for Na^{+} -dependent sugar transport in Caco-2 cells and human fetal colon. 1987. J. Membr. Biol. V. 99. P. 113.
- Bourzac J.F., L'eriger K., Larrivée J.F., Arguin G., Bilodeau M.S., Stankova J., Gendron F.P. 2013. Glucose

- transporter 2 expression is down regulated following P2X7 activation in enterocytes. *J. Cell. Physiol.* V. 228. P. 120. <https://doi.org/10.1002/jcp.24111>
- Brown E.M. 2013. Role of the calcium-sensing receptor in extracellular calcium homeostasis. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* V. 27. P. 333. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2013.02.006>
- Chung H.K., Rathor N., Wang S.R., Wang J.Y., Rao J.N. 2015. RhoA enhances store-operated Ca^{2+} entry and intestinal epithelial restitution by interacting with TRPC1 after wounding. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* V. 309. P. G759. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00185.2015>
- DebRoy A., Vogel S.M., Soni D., Sundivakkam P.C., Malik A.B., Tiruppathi C. 2014. Cooperative signaling via transcription factors NF- κ B and AP1/c-Fos mediates endothelial cell STIM1 expression and hyperpermeability in response to endotoxin. *J. Biol. Chem.* V. 289. P. 24188. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.570051>
- Diaz R., Hurwitz S., Chattopadhyay N., Pines M., Yan, Y., Kifor O., Brown E.M. 1997. Cloning, expression, and tissue localization of the calcium-sensing receptor in chicken (*Gallus domesticus*). *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* V. 273. P. R1008. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1997.273.3.R1008>
- Eylenstein A., Schmidt S., Gu S., Yang W., Schmid E., Schmidt E.M., Alesutan I., Szteyn K., Regel I., Shumilina E., Lang F. 2012. Transcription factor NF- κ B regulates expression of pore-forming Ca^{2+} channel unit, Orail1, and its activator, STIM1, to control Ca^{2+} entry and affect cellular functions. *J. Biol. Chem.* V. 287. P. 2719. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.275925>
- Gorboulev V., Schürmann A., Vallon V., Kipp H., Jaschke A., Klessen D., Friedrich A., Scherneck S., Rieg T., Cunard R., Veyhl-Wichmann M., Srinivasan A., Balen D., Breljak D., Rexhepaj R., et al. 2012. Na^{+} -D-glucose cotransporter SGLT1 is pivotal for intestinal glucose absorption and glucose-dependent incretin secretion. *Diabetes.* V. 61. P. 187. <https://doi.org/10.2337/db11-1029>
- Hall E., Nitert M.D., Volkov P., Malmgren S., Mulder H., Bacos K., Ling C. 2018. The effects of high glucose exposure on global gene expression and DNA methylation in human pancreatic islets. *Mol. Cell. Endocrinol.* V. 472. P. 67. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.11.019>
- Helliwell P.A., Rumsby M.G., Kellett G.L. 2003. Intestinal sugar absorption is regulated by phosphorylation and turnover of protein kinase C β II mediated by phosphatidylinositol 3-kinase-and mammalian target of rapamycin-dependent pathways. *J. Biol. Chem.* V. 278. P. 28644. <https://doi.org/10.1074/jbc.M301479200>
- Hoenderop J.G., Nilius B., Bindels R.J. 2002. ECaC: the gatekeeper of transepithelial Ca^{2+} transport. *Biochim. Biophys. Acta—Proteins Proteom.* V. 1600. P. 6. [https://doi.org/10.1016/s1570-9639\(02\)00438-7](https://doi.org/10.1016/s1570-9639(02)00438-7)
- Kellett G.L. 2001. The facilitated component of intestinal glucose absorption. *Physiol. J.* V. 531. P. 585. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2001.0585h.x>
- Kellett G.L., Helliwell P.A. 2000. The diffusive component of intestinal glucose absorption is mediated by the glucose-induced recruitment of GLUT2 to the brush-border membrane. *Biochem. J.* V. 350. P. 155.
- Koster H.P.G., Hartog A., Bindels R.J.M. 1995. Calbindin-D28K facilitates cytosolic calcium diffusion without interfering with calcium signaling. *Cell Calcium.* V. 18. P. 187. [https://doi.org/10.1016/0143-4160\(95\)90063-2](https://doi.org/10.1016/0143-4160(95)90063-2)
- Kuhre R.E., Christiansen C.B., Saltiel M.Y., Wewer Albrechtsen N.J., Holst J.J. 2017. On the relationship between glucose absorption and glucose-stimulated secretion of GLP-1, neurotensin, and PYY from different intestinal segments in the rat. *Physiol. Rep.* V. 5. P. e13507. <https://doi.org/10.14814/phy2.13507>
- Mace O.J., Morgan E.L., Affleck J.A., Lister N., Kellett G.L. 2007. Calcium absorption by Cav1.3 induces terminal web myosin II phosphorylation and apical GLUT2 insertion in rat intestine. *Physiol. J.* V. 580. P. 605. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.124784>
- Mace O.J., Morgan E.L., Affleck J.A., Lister N., Kellett G.L. 2007. Calcium absorption by Cav1.3 induces terminal web myosin II phosphorylation and apical GLUT2 insertion in rat intestine. *Physiol. J.* V. 580. P. 605. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.124784>
- Morgan E.L., Mace O.J., Affleck J., Kellett G.L. 2007. Apical GLUT2 and Cav1.3: regulation of rat intestinal glucose and calcium absorption. *Physiol. J.* V. 580. P. 593. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.124768>
- Nijenhuis T., Hoenderop J.G., Nilius B., Bindels R.J. 2003. (Patho) physiological implications of the novel epithelial Ca^{2+} channels TRPV5 and TRPV6. *Pflügers Arch.* V. 446. P. 401. <https://doi.org/10.1007/s00424-003-1038-7>
- Peng J.B., Chen X.Z., Berger U.V., Vassilev P.M., Tsukaguchi H., Brown E.M., Hediger M.A. 1999. Molecular cloning and characterization of a channel-like transporter mediating intestinal calcium absorption. *J. Biol. Chem.* V. 274. P. 22739. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.32.22739>
- Röder P.V., Geillinger K.E., Zietek T.S., Thorens B., Koepsell H., Daniel H. 2014. The role of SGLT1 and GLUT2 in intestinal glucose transport and sensing. *PloS one.* V. 9. P. e89977. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089977>
- Tharabenjasin P., Douard V., Patel C., Krishnamra N., Johnson R.J., Zuo J., Ferraris R.P. 2014. Acute interactions between intestinal sugar and calcium transport *in vitro*. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* V. 306. P. G1–G12.
- Westerhout J., van de Steeg E., Grossouw D., Zejdner E.E., Krul C.A.M., Verwei M., Wortelboer H.M. 2014. A new approach to predict human intestinal absorption using porcine intestinal tissue and biorelevant matrices. *Eur. J. Pharm. Sci.* V. 63. P. 167. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2014.07.003>
- Yee S. 1997. *In vitro* permeability across Caco-2 cells (colonic) can predict *in vivo* (small intestinal) absorption in man—fact or myth. *Pharm. Res.* V. 14. P. 763. <https://doi.org/10.1023/a:1012102522787>
- Zheng Y., Scow J.S., Duenes J.A., Sarr M.G. 2012. Mechanisms of glucose uptake in intestinal cell lines: role of GLUT2. *Surgery.* V. 151. P. 13. <https://doi.org/10.1016/j.surg.2011.07.010>

ROLE OF CALCIUM CHANNELS IN GLUCOSE UPTAKE REGULATION IN THE *IN VITRO* MODEL OF POLARIZED INTESTINAL EPITHELIUM

D. E. Bobkov^a, A. V. Lukacheva^a, L. V. Kever^a, V. V. Furman^a, S. B. Semenova^{a, *}

^a *Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 194064, Russia*

* *E-mail: svsem@incras.ru*

Glucose is the main energy substrate that ensures metabolic processes in the human and animal bodies. Impaired carbohydrate metabolism is often associated with obesity and concomitant diseases, such as cardiovascular diseases, arterial hypertension, insulin resistance, etc. Current data indicate that intestinal glucose absorption is coupled with Ca²⁺ influx, but additional research is needed to confirm this interaction. We used a cellular model of human intestinal epithelium to elucidate the role of Ca²⁺ channels in the regulation of glucose absorption. The results of immunofluorescence and immunoelectron microscopy showed that high cellular glucose loading (50 mM) leads to an increase in the density of TRPV6 calcium channels on the apical membrane of the intestinal epithelium. The level of the calcium sensor STIM1, responsible for store-dependent calcium entry (SOCE), on the contrary, showed a decrease when Caco-2 cells were overloaded with glucose, which was accompanied by a decrease in SOCE. Excessive saturation of Caco-2 cells with glucose also led to a decrease in the expression level of the NF-κB transcription factor p65 subunit responsible for the expression of STIM1. The results showed that Ca²⁺ channels are not only involved in the regulation of glucose uptake, but may themselves be under the control of glucose.

Keywords: cell, intestinal epithelial, calcium entry, TRPV6 calcium channel, glucose, GLUT2 transporter