

© Е.В.Селивёрстова, М.В.Бурмакин, Е.И.Шахматова, А.В.Смирнов, В.А.Добронравов, В.Г.Сиповский, О.Н.Береснева, М.М.Парастаева, Т.А.Канашкина, М.М. Мнускина, Ю.В.Наточин, 2007  
УДК 616.61-008.64-036.11-092.4:616.34:616.153.96

*Е.В. Селивёрстова, М.В. Бурмакин, Е.И. Шахматова, А.В. Смирнов, В.А. Добронравов, В.Г. Сиповский, О.Н. Береснева, М.М. Парастаева, Т.А. Канашкина, М.М. Мнускина, Ю.В. Наточин*

## АККУМУЛЯЦИЯ В ПОЧКЕ ЭКЗОГЕННОГО БЕЛКА ПОСЛЕ ЕГО ВСАСЫВАНИЯ В КИШЕЧНИКЕ ПРИ РАЗВИТИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ПОЧЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ У КРЫС

*E.V. Seliverstova, M.V. Burmakin, E.I. Shakhmatova, A.V. Smirnov, V.A. Dobronravov, V.G. Sipovsky, O.N. Beresneva, M.M. Parastaeva, T.A. Kanashkina, M.M. Mnuskina, Yu.V. Natochin*

## ACCUMULATION IN THE KIDNEY OF EXOGENOUS PROTEIN AFTER ITS ABSORPTION IN THE INTESTINE DURING THE DEVELOPMENT OF EXPERIMENTAL RENAL FAILURE IN RATS

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М.Сеченова РАН, Научно-исследовательский институт нефрологии Санкт-Петербургского государственного медицинского университета имени акад. И.П. Павлова, Россия

### РЕФЕРАТ

**ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ** – изучение возможности накопления в почке крыс зеленого флуоресцентного белка (ЗФБ) в условиях экспериментальной хронической почечной недостаточности (ХПН). **МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** Экспериментальную группу составили крысы линии Вистар (n=13), подвергнувшись субтотальной нефрэктомии (СНЭ), через 8 недель после которой животным через желудочный зонд вводили ЗФБ. В качестве контрольной группы использовали животных с интактными почками (n=12). В обеих группах определяли концентрацию креатинина, мочевины плазмы крови, суточный диурез, концентрацию альбумина и креатинина мочи с расчетом отношения альбумин/креатинин (ACR), концентрационного индекса ( $U_{cr}/P_{cr}$ ) и клиренса креатинина ( $C_{cr}$ ), а также проводили светооптическое и электронномикроскопическое исследование почек. Для оценки накопления ЗФБ в энтероцитах и клеточных популяциях нефрона применяли конфокальную микроскопию. **РЕЗУЛЬТАТЫ.** Установлено, что ЗФБ всасывается энтероцитами и, поступая в системную циркуляцию, накапливается в везикулах клеток проксимального канальца (ПК). Морфологические и функциональные изменения у крыс с развивающейся почечной недостаточностью после СНЭ сопровождается значительным снижением накопления ЗФБ в ПК в сравнении с животными без дисфункции почек. **ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** На примере модели с ЗФБ у животных с экспериментальной ХПН впервые продемонстрирована принципиальная возможность энтерального транспорта и накопления в клетках проксимального сегмента нефрона интактных чужеродных белков. Полученные данные открывают новые перспективы для изучения роли почек в метаболизме экзогенных протеинов.

**Ключевые слова:** почка, экспериментальная почечная недостаточность, зеленый флуоресцентный белок, конфокальная микроскопия, канальцы.

### ABSTRACT

**THE AIM** of the investigation was to study the possibilities of accumulation of the green fluorescent protein (GFP) in the rat kidney under conditions of experimental chronic renal failure (CRF). **MATERIALS AND METHODS.** The experimental group consisted of 13 Wistar rats subjected to subtotal nephrectomy (SNE). In eight days after operation GFP was introduced to the animals through stomach probe. The control group consisted of 12 rats with intact kidneys. The concentration of creatinine, blood plasma urea, diurnal diuresis, concentration of albumin and urine creatinine with calculation of the albumine/creatinine ratio (ACR), concentration index ( $U_{cr}/P_{cr}$ ) and creatinine clearance ( $C_{cr}$ ) were determined in both groups. In addition, light-optical and electron-microscopic investigations were carried on. Confocal microscopy was used for the assessment of accumulation of GFP in the erythrocytes and

<sup>1</sup> В этом номере журнала в качестве передовых статей Редколлегия решила разместить две не совсем обычных для данной рубрики работы. Первая представляет собой описание результатов оригинального экспериментального исследования, выполненного большой группой сотрудников Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М.Сеченова РАН и Санкт-Петербургского государственного медицинского университета имени акад. И.П. Павлова, под руководством акад. РАН Ю.В. Наточина. На наш взгляд в ней содержатся принципиально новые сведения об обмене белка, которые в том числе дают основания существенно пересмотреть ряд общепринятых представлений об участии почек в этом процессе. Вторая подготовлена новым членом Редколлегии, заведующим кафедрой клинической лабораторной диагностики Санкт-Петербургского государственного медицинского университета имени акад. И.П. Павлова, д.м.н. профессором В.Л. Эммануэлем, которого мы рады представить нашим читателям, и содержит сведения о современных подходах к выполнению и трактовке результатов анализа мочи, что представляет огромный интерес для подавляющего большинства практических врачей.

cell populations of the nephron. *RESULTS.* It has been found that GFP is absorbed by erythrocytes and, on coming into the systemic circulation, is accumulated in the cell vesicles of the proximal tubules (PT). Morphological and functional changes in the rats with the developing renal failure after SNE are followed by a considerable decrease of accumulation of GFP in PT as compared with the animals without dysfunction of the kidneys. *CONCLUSION.* The example of the model with GFP in animals with experimental CRF for the first time has demonstrated the fundamental possibility of enteral transport and accumulation of intact foreign proteins in the cells of the proximal nephron segment. The data obtained open new perspectives for studying the role of the kidneys in metabolism of exogenous proteins.

**Key words:** kidney, experimental renal failure, green fluorescent protein, confocal microscopy, tubules.

## ВВЕДЕНИЕ

Изучение белкового метаболизма при хронической болезни почек (ХБП) привлекает внимание исследователей по ряду причин. Важнейшим проявлением ренальной дисфункции служит снижение скорости клубочковой фильтрации (СКФ) с последующим увеличением концентрации конечных продуктов белкового обмена (мочевина, креатинин) в сыворотке крови, при этом протеинурия рассматривается как значимый фактор развития хронической почечной недостаточности (ХПН) [1]. В этом случае проблема заключается не столько в потере белка с мочой, сколько в избыточном поступлении белков в просвет проксимального сегмента нефрона и в чрезмерной нагрузке на системы реабсорбции и гидролиза белков в его клетках [2].

Обычно молчаливо полагают, что протеинурия обусловлена фильтрацией в клубочках белков эндогенного происхождения. При этом не учитывают возможности всасывания в тонкой кишке нерасщепленных белков и полипептидов пищи, хотя имеются данные о том, что всасывание в таком виде происходит в кишке животных и человека [3].

В связи с изложенным представляет значительный интерес оценка возможности почек по обработке эндогенных и экзогенных белков, а в частности – возможность всасывания чужеродных белков в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ) и их поступление в клетки проксимального отдела нефрона в условиях почечной дисфункции. Существенным представляется выбор модели почечной недостаточности, а также экзогенного белка. Использование модели с токсическим поражением почки, например, после введения цисплатина [4], или в результате воспалительного повреждения почки [5,6] могло создать трудности в оценке результатов. В этих случаях в наблюдающихся изменениях всасывания белков было бы необходимо вычленить роль не только развивающейся почечной недостаточности, но и влияние процесса воспаления или действия токсического агента как такового. В связи с этим в качестве модели была избрана почечная недостаточность, развивающаяся при субтотальной нефрэктомии (СНЭ). Для характеристики состояния функции почки, связан-

ной с реабсорбцией чужеродных белков, служила разработанная нами модель всасывания флуоресцентного белка [7]. В качестве маркерного белка был использован зеленый флуоресцентный белок (ЗФБ), который флуоресцирует только в том случае, когда его молекула интактна и имеет сохраненную третичную структуру [8]. Исследование возможности и особенностей накопления этого белка в почке крыс при развивающейся ХПН и послужило основной целью настоящей работы.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

*Объект исследования и структура эксперимента.* Исследование выполнено на самцах крыс линии Wistar массой тела 190-220 г, которых содержали в стандартных условиях вивария Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова. Для создания экспериментальной уремии был применен метод СНЭ [9]. В этой модели прогрессирующая дисфункция почек наступает в результате значительной редукции функционирующей массы почки, что приводит к развитию процессов гломерулярной гипертензии/гиперфильтрации и прогрессирующему гломерулосклерозу и протеинурии [10,11].

Под наркозом (тиопентал натрия 50 мг/кг внутримышечно) с использованием заднепоясничного доступа у крыс удаляли 2/3 массы левой почки. Через неделю выполняли правостороннюю нефрэктомию. Для сохранения надпочечников почки перед резекцией декапсулировали. В ходе эксперимента животных содержали на стандартном лабораторном пищевом рационе и свободном доступе к воде. Через 8 недель после СНЭ у ненаркотизированных крыс проводили функциональное исследование оставшейся почки, на следующий день под легким эфирным наркозом брали кровь и ткани для морфологического и биохимического исследования.

К началу эксперимента, через 2 месяца после СНЭ, масса крыс составляла 250-300 г, в среднем увеличиваясь на 34%. Накануне взятия крови и тканей у крыс собирали суточную мочу. Для этого животных помещали в индивидуальные метаболические клетки. Определяли объем выделившейся за сутки мочи (V), концентрацию альбумина в моче

( $U_{alb}$ ) и креатинина ( $U_{Cr}$ ), рассчитывали отношение альбумин/креатинин ( $U_{alb}/U_{Cr}$ ) – показателя отражающего суточную экскрецию альбумина с мочой, а также клиренс креатинина ( $C_{Cr}$ ).

В день опыта ненаркотизированным крысам вливали в желудок 0,15 мл ЗФБ через резиновый зонд. Раствор этого белка в концентрации 0,34 мкг/мл готовили на 0.01 М PBS-буфере, pH 7,3. Здоровым крысам-самцам контрольной группы вводили через зонд по 0,15 мл раствора флюоресцентного белка. Через 20, 120 и 300 мин после введения белков под легким эфирным наркозом крыс декапитировали, вскрывали брюшную полость и выделяли фрагмент (2 см) тонкого кишечника на расстоянии 20 см от двенадцатиперстной кишки, а также фрагменты коркового и мозгового вещества почки.

Для количественной оценки состояния гидратационного статуса в тканях животных определяли содержание воды в расчете на грамм сухого вещества мышцы бедра, тонкой кишки и коры почки. Для этого у крыс выделяли кусочки этих органов, помещали на кварцевые подложки и взвешивали на микроаналитических весах (Mettler AJ100, Швейцария). После взвешивания пробы на кварцевых стеклах помещали на штатив и высушивали в термостате при температуре 105°C в течение 24 ч до постоянного веса, затем вновь взвешивали и рассчитывали содержание воды в ткани.

*Морфологические методы исследования.* Для светооптической микроскопии кусочки паренхимы почки массой до 100 мг фиксировали в нейтральном 10%-м формалине в течение 24 ч. После стандартной проводки [12] 5–7-микронные парафиновые срезы окрашивали гематоксилином-эозином, по Вейгерту, трихромальной окраской по Массону и проводили PAS-реакцию. Полученные срезы исследовали с помощью микроскопа MICROS 200 A (Австрия).

Выделенные образцы для конфокальной микроскопии фиксировали в растворе 4%-го параформальдегида (Sigma, США) на 0,01 М PBS, pH 7,3 в течение 2 часов, затем дважды по 15 мин отмывали PBS, после чего пропитывали в 30%-м растворе сахарозы на PBS в течение 12 ч при температуре 4°C. Для получения гистологических срезов кусочки ткани заключали в криогель (Bright, Англия), замораживали в жидком азоте и готовили срезы толщиной 5–7 мкм в криостате Leica CM1510 (Германия) при -20°C. Полученные срезы помещали на покровные стекла, высушивали при комнатной температуре и с помощью раствора глицерина и PBS (в соотношении 1:1) монтировали на предметные стекла. Препараты изучали в микроскопе TSC SL (Leica, Германия) с конфокальной приставкой DM R (Leica, Германия).

Для анализа изображений, полученных в конфокальном микроскопе, использовали компьютерную программу Image Tool III. Измеряли интенсивность флюоресценции равных площадей сопоставляемых участков эпителия тонкой кишки и проксимального сегмента нефрона, значение интенсивности выражали в условных единицах. Основой расчета было соотношение флюоресцирующих точек (пикселей) в пределах данного участка к несветящимся точкам (шкала от 0 до 256). Для изучения распределения флюоресценции по длине ворсинки кишки на различных гистологических срезах анализировали участки эпителия (по 100 имиджей в каждом опыте) из верхней трети ворсинок кишки и зоны крипт. Для оценки интенсивности свечения клетку эпителия измеряли целиком, включая щеточную кайму. Для определения величины специфической флюоресценции исследуемого белка из значения общей флюоресценции в экспериментах с введением маркерных белков вычитали величину фонового свечения соответствующего контрольного опыта.

Для изучения ультраструктуры клеток эпителия проксимального отдела нефрона кусочки коры почек фиксировали в растворе 2,5% глутарового альдегида на 0.1 М натрий-какодиллатном буфере (pH 7.2–7.4) в течение 30 мин, отмывали в том же буфере и постфиксировали в растворе 1% четырехоксида осмия на 0.1 М натрий-какодиллатном буфере. Затем образцы обезвоживали в серии спиртов возрастающей концентрации, абсолютном ацетоне и заключали в смесь эпона и аралдита. Ультратонкие срезы готовили на ультратоме Leica Ultracut UCT (Германия), собирали на медные сетки и затем контрастировали растворами уранил-ацетата и цитрата свинца. Полученные образцы изучали в электронном микроскопе Leo-910 (Leica, Германия) при ускоряющем напряжении 60 кВ.

*Методы лабораторного анализа.* Осмоляльность проб сыворотки крови и мочи определяли с помощью миллиосмометра МТ-4 (Буревестник, Санкт-Петербург). Концентрация ионов  $Na^+$  и  $K^+$  в сыворотке крови была измерена на анализаторе AVL 9140 (США), в моче – на пламенном фотометре (Corning 410, Великобритания) в воздушно-пропановом пламени, концентрация ионов  $Ca^{2+}$  и  $Mg^{2+}$  – на атомном абсорбционном спектрофотометре (Hitachi, мод. 508, Япония). Для построения калибровочной кривой были использованы стандарты фирмы Sigma и Aldrich Chemical Company Inc. (США).  $U_{alb}$  определяли иммунохимическим методом с нефелометрической детекцией на автоматическом анализаторе Array-360 (Beckmann, США). Содержание в крови и моче всех остальных

ных показателей определяли по стандартным методикам на биохимическом автоанализаторе (COBAS MIRA, Beckmann, США).

**Статистическая обработка.** Различия в группах определяли с использованием стандартных непараметрических тестов сравнения в лицензионном пакете статистических программ SPSS 11.0. Достоверными считали различия при значении  $p < 0.05$ .

**Реактивы.** GFP (зеленый флюоресцентный белок) получен из лаборатории механизмов биосинтеза белка (Институт белка РАН, Пущино на Оке).

Эксперименты проводили в соответствии с международными стандартами по работе с экспериментальными животными.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

**Функциональное состояние почек животных.** У экспериментальных животных через 8 недель после СНЭ было отмечено снижение  $C_{Cr}$ , сопровождавшееся увеличением концентрации креатинина и мочевины в сыворотке крови (табл. 1), что соответствовало развитию 1-2 стадии экспериментальной ХПН [8]. Другими маркерами ренальной дисфункции являлись увеличение мочевого экскреции альбумина, отражающее процессы гиперфилтрации в остаточных нефронах, и снижение его сывороточной концентрации (табл. 2). Сыворотка крови крыс, подвергнутых СНЭ, не отличалась от контрольных животных по осмоляльности и концентрации ионов Na, K, Mg, Ca, что, очевидно, обусловлено развитием компенсаторной гипертрофии оставшейся части почки, обеспечивающей сохранность основных гомеостатических параметров жидкостей внутренней среды на данном этапе развития дисфункции почек (табл. 1). Вместе с тем, в группе экспериментальной ХПН выделение натрия с мочой было снижено (табл. 2), а экскреция осмо-

Таблица 1

### Показатели сыворотки крови у здоровых крыс и при частичной нефрэктомии ( $\bar{X} \pm SD$ )

Параметры	Контроль (n=12)	ХПН (n=13)
$P_{Cr}$ , мкмоль/л	45,8±5,9	67,4±9,5***
$C_{Cr}$ , мл/мин	1,28±0,47	0,8±0,22**
$P_{Uc}$ , ммоль/л	5,6±0,8	13,0±2,1***
$P_{UA}$ , мкмоль/л	61,5±10,1	71,4±17,5*
$P_{Alb}$ , г/л	38,8±1,5	33,5±3,2**
$P_{Osm}$ , мосм/кг	308±5	312±6 <sup>ns</sup>
$P_{Na}$ , ммоль/л	139±2	139±2 <sup>ns</sup>
$P_{K}$ , ммоль/л	4,7±0,4	4,8±0,4 <sup>ns</sup>
$P_{Mg}$ , ммоль/л	0,9±0,1	0,9±0,3 <sup>ns</sup>
$P_{Ca}$ , ммоль/л	2,2±0,2	2,3±0,2 <sup>ns</sup>

Примечание. Достоверность отличий по отношению к контролю во всех таблицах: \* -  $p < 0.05$ , \*\* -  $p < 0.01$ , \*\*\* -  $p < 0.001$ , <sup>ns</sup> - недостоверно.

Таблица 2

### Показатели функции почки у здоровых крыс и при частичной нефрэктомии ( $M \pm SD$ )

Параметры	Контроль (n=12)	ХПН (n=13)
$V_f$ , мкл/мин100 г	2,1±0,6	2,7±0,7 <sup>ns</sup>
$U_{Osm}$ , мосм/кг $H_2O$	1263±298	1119±175 <sup>ns</sup>
$U_{Na}$ , ммоль/л	87±29	32±18*
$U_K$ , ммоль/л	160±24	160±28 <sup>ns</sup>
$U_{Mg}$ , ммоль/л	7±5	11±4 <sup>ns</sup>
$U_{Ca}$ , ммоль/л	0,4±0,1	0,3±0,2 <sup>ns</sup>
$U_{Cr}$ , ммоль/л	8,8±2,7	7,9±2,0 <sup>ns</sup>
$U_{Alb}$ , мг/л	3,6±3,8	45,7±56,0**
$U_{Alb}/U_{Cr}$ , мг/г	0,23±0,21	7,1±8,8**
$C_{H_2O}$ , мкл/мин100 г	-6,0±0,3	-6,7±1,2 <sup>ns</sup>
$C_{Osm}$ , мкл/мин100 г	8,0±0,6	9,4±1,8*
$C_{Na}$ , мкл/мин100 г	1,3±0,6	0,7±0,4 <sup>ns</sup>
$C_{K}$ , мкл/мин100 г	0,8±0,5	2,0±0,5**
$U_{Osm} V_f$ , мкосм/мин100г	2,46±0,19	2,94±0,57*
$U_{Na} V_f$ , мкмоль/мин100г	0,17±0,06	0,09±0,02*
$U_K V_f$ , мкмоль/мин100г	0,32±0,05	0,43±0,12*
$U_{Mg} V_f$ , мкмоль/мин100г	0,013±0,010	0,029±0,010 <sup>ns</sup>
$U_{Ca} V_f$ , мкмоль/мин100г	0,0007±0,0004	0,0009±0,0006 <sup>ns</sup>

Примечание. Достоверность отличий по отношению к контролю во всех таблицах: \* -  $p < 0.05$ , \*\* -  $p < 0.01$ , <sup>ns</sup> - недостоверно.

тически активных веществ оказалась выше, что зависит от выделения других ионов и мочевины.

При исследовании состояния гидратации тканей у крыс с СНЭ не было найдено достоверных отличий от контроля по содержанию воды в мышцах бедра, тонкой кишке и мозговом веществе почки (табл. 3). Увеличение содержания воды обнаружено только в корковом слое почки (см. табл. 3).

**Морфологическая картина почки.** У контрольных животных при световой микроскопии состояние интерстиция и клубочков соответствовало описанной норме [13]. Неизменную структуру клеток эпителия проксимальных канальцев (рис. 1а) характеризовала светлая гомогенная цитоплазма с базально-расположенными ядрами (черная стрелка). Апикальная часть клеток в области щеточной каемки имела PAS-положительную реакцию. Клубочки интактных животных с тонкопетлистыми капиллярами свободно располагались в мочевом пространстве (рис. 1б). Мезангиальный матрикс был представлен в незначительном количестве, в котором выявляли только единичные мезангиоциты (см. рис. 1б).

Таблица 3

### Содержание воды (г/г сухого вещества ткани) у здоровых крыс и при частичной нефрэктомии ( $\bar{X} \pm m$ )

Исследуемые ткани	Контроль (n=12)	Субтотальная нефрэктомия (n=13)
Мышца бедра	3,05±0,05	3,08±0,02 <sup>ns</sup>
Тонкая кишка	2,97±0,17	3,22±0,04 <sup>ns</sup>
Кора почки	2,77±0,09	3,05±0,07*
Мозговое вещ-во	4,08±0,38	3,81±0,12 <sup>ns</sup>

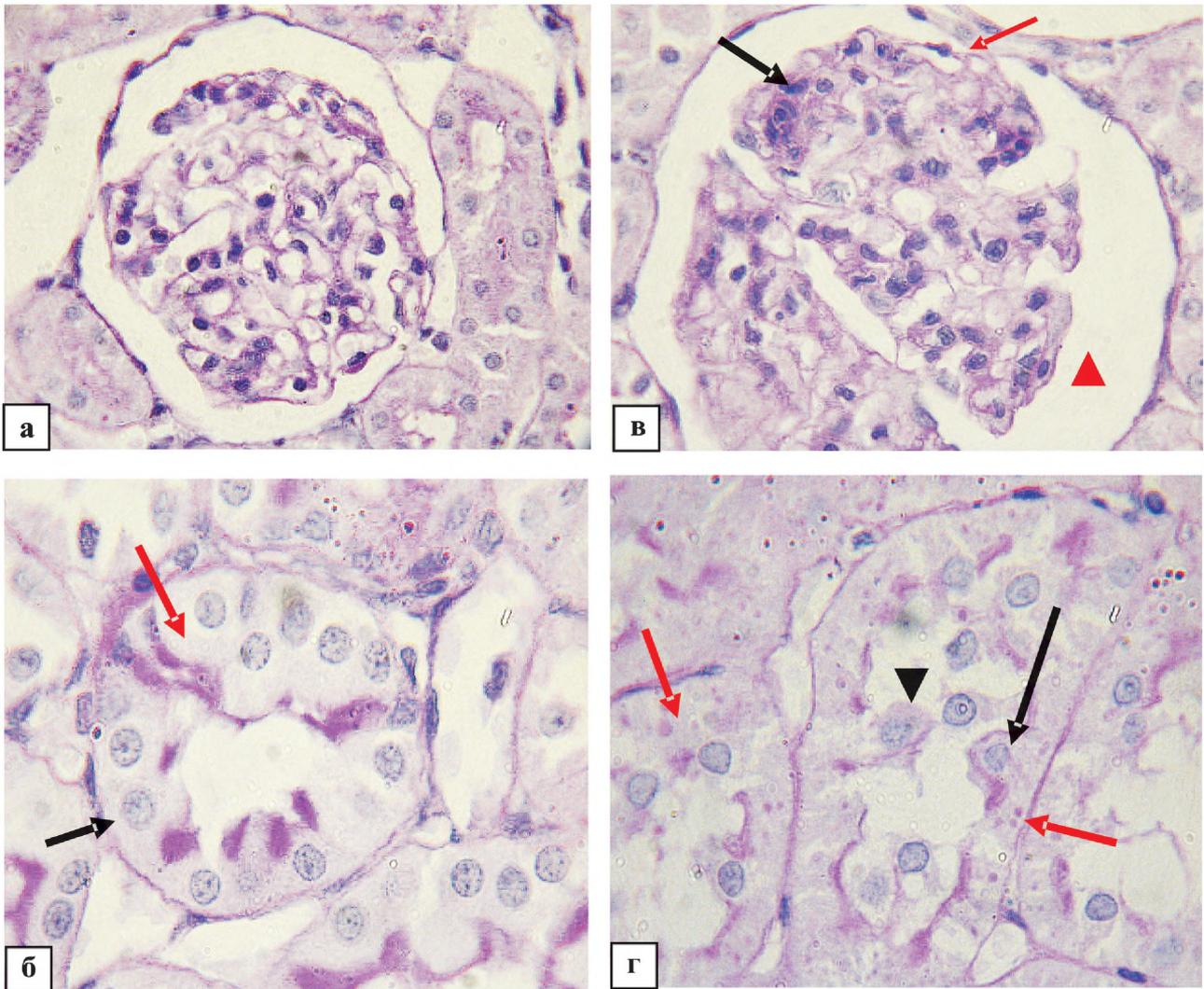


Рис.1. Строение коры почек контрольных животных (а, б) и животных после СНЭ (в, г). PAS-реакция. **а** – Структура клубочка интактных крыс с тонкими базальными мембранами капилляров, единичными эндотелиоцитами и скудным мезангиальным матриксом. Увеличение  $\times 350$ . **б** – Нормальная структура эпителия проксимальных канальцев, имеющих светлую гомогенную цитоплазму (красная стрелка) и базально-расположенное ядро (черная стрелка). Апикальная часть клеток в области щеточной каемки имеет PAS-положительную реакцию. Увеличение  $\times 450$ . **в** – Структура изменений в клубочках на фоне 5/6 НЭ. Выявляется увеличение в размерах клубочка, расширение мочевого пространства Боуменовой капсулы (красный наконечник стрелки). Сегментарная гиперклеточность мезангия с расширением мезангиального матрикса (черная стрелка) и спайками (красная стрелка). Увеличение  $\times 350$ . **г** – Структурные изменения в эпителии проксимальных канальцев у животных с 5/6 НЭ. Отмечается появление в цитоплазме клеток значительного числа PAS-позитивных гранул (красные стрелки), апикальное расположение ядер клеток (черная стрелка), слущивание клеток в просвет проксимальных канальцев (наконечник стрелки). Увеличение  $\times 450$ .

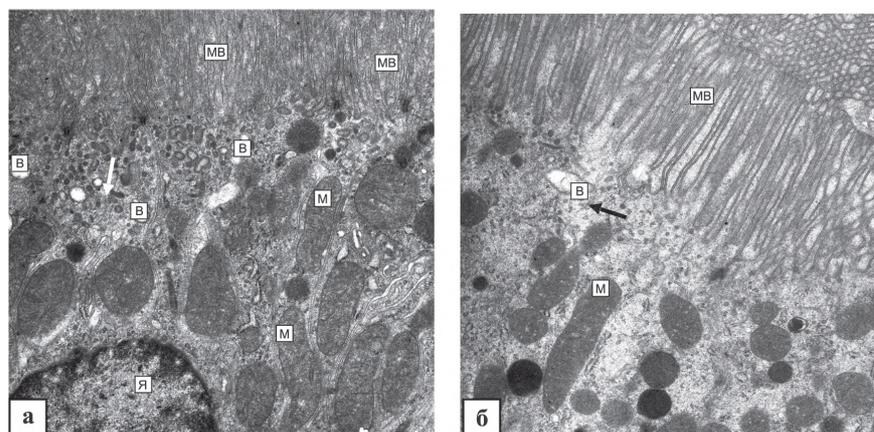


Рис. 2. Ультраструктура клеток проксимального сегмента нефрона у контрольных животных (**а**) и крыс после СНЭ (**б**). Стрелками указаны элементы тубуло-везикулярного компартамента эпителиоцитов. В – везикулы, М – митохондрии, МВ – микроворсинки, Я – ядро.

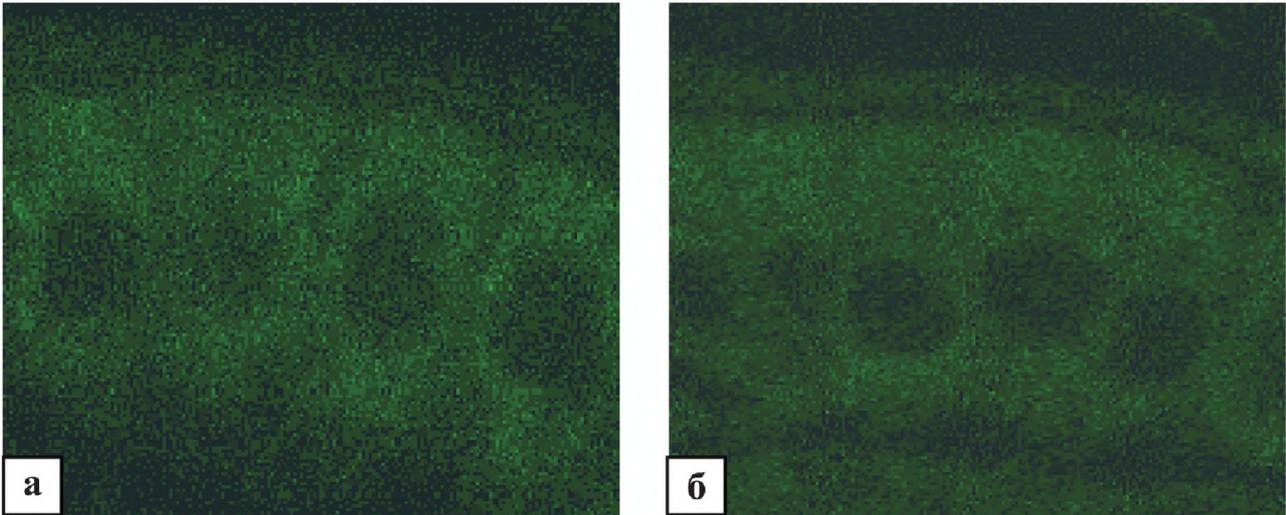


Рис. 3. Флюоресценция энтероцитов после введения в просвет тонкой кишки раствора ЗФБ у здоровых крыс (а) и у крыс после СНЭ (б).

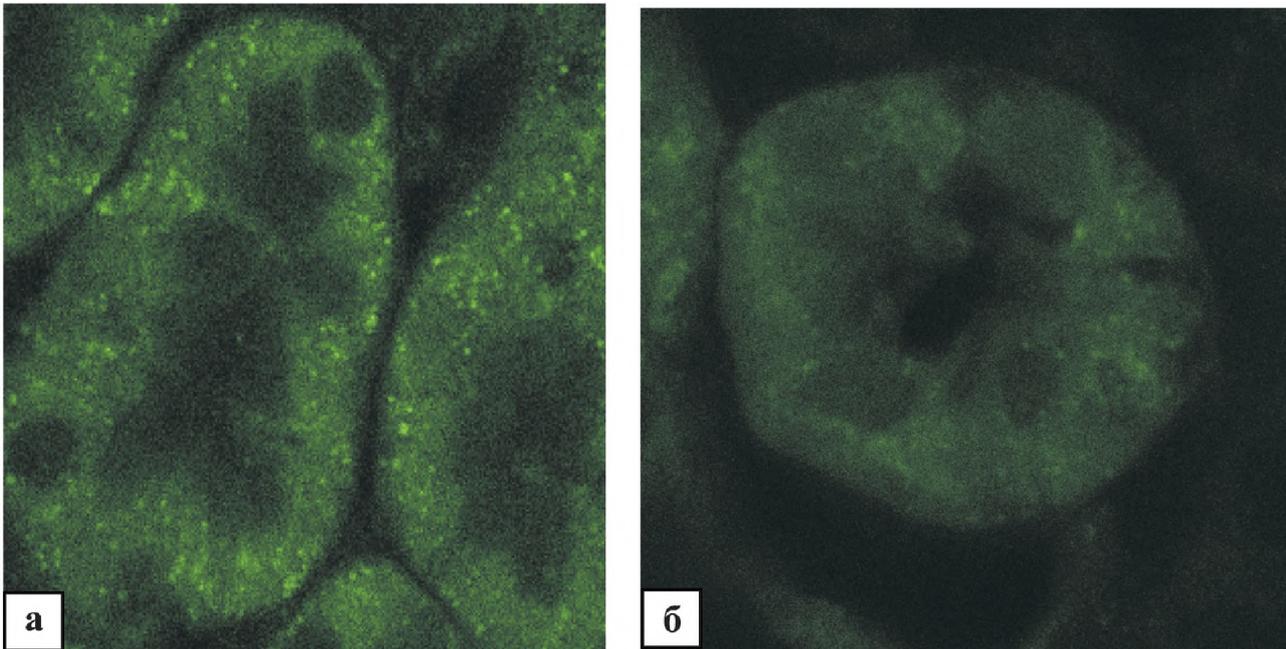


Рис. 4. Флюоресценция клеток эпителия проксимального канала после введения в просвет тонкой кишки раствора ЗФБ у здоровых крыс (а) и у крыс после СНЭ I(б).

У животных, подвергнутых СНЭ, светооптически были обнаружены закономерные морфологические изменения в различных отделах нефрона. В сравнении с интактными крысами наблюдали приблизительно 1,5-кратное увеличение размера клубочков с расширением мочевого пространства Боуеновой капсулы, расширение мезангиального матрикса с умеренным увеличением количества мезангиоцитов, спайки капиллярных петель со стенками капсулы, а также сдавление капиллярных петель (рис. 1, г). Кроме этого в отдельных клубочках выявляли очаговый склероз капсулы и склероз капиллярных петель, причем измененные клубочки иногда имели при этом лапчатую форму.

Существенные морфологические изменения обнаружены в проксимальных каналах. Среди

них можно отметить увеличение содержания в цитоплазме клеток PAS-позитивных гранул, появление интрацитоплазматических вакуолей, выбухание апикальной части цитоплазматической мембраны клеток канальцев в просвет, а также апикальное и интермедиарное положение ядер у значительного числа клеток (рис. 1, в). Наряду с этим встречались очаговые расхождения межклеточных контактов, локальное исчезновение PAS-положительной реакции щеточной каемки и сдвигивание некоторых клеток в просвет канальцев.

Электронно-микроскопическое исследование коры почек показало снижение количества элементов тубуло-везикулярной сети в апикальной части цитоплазмы эпителиоцитов, а также деформацию микроворсинок апикальной мембраны у животных

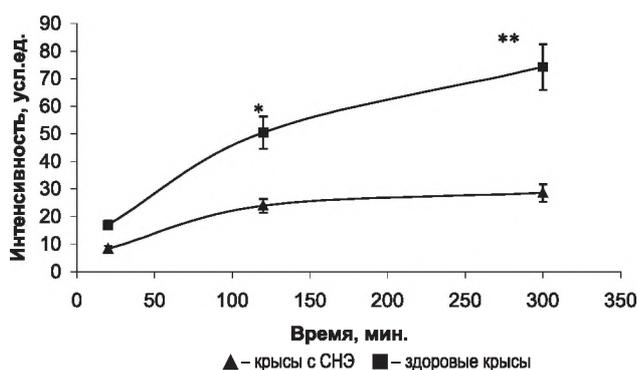


Рис. 5. Динамика интенсивности флюоресценции клеток эпителия проксимального канальца почки после перорального введения ЗФБ. Абсцисса – время, минуты. Ордината – интенсивность флюоресценции в условных единицах. Достоверность отличий интенсивности флюоресценции в контроле и у крыс после СНЭ (\* -  $p < 0.05$ , \*\* -  $p < 0.001$ ).

после СНЭ почек (рис. 2, а,б). Особенно отчетливо эти изменения выявлялись в клетках проксимального канальца через 5 ч после введения ЗФБ.

Таким образом, наряду с функциональными, в оставшейся части почки у крыс с СНЭ обнаружены и морфологические изменения, характерные для ранних стадий развития экспериментальной ХПН и касающиеся гломерулярного аппарата [14], а также структуры клеток проксимального сегмента нефрона.

*Всасывание ЗФБ в желудочно-кишечном тракте и его накопление в проксимальных канальцах почки.* Изучение срезов тонкой кишки крыс в конфокальном микроскопе показало, что через 20 мин после введения ЗФБ в просвет желудочно-кишечного тракта в клетках эпителия тонкой кишки выявляется специфическая флюоресценция этого белка (рис. 3). Она была практически одинакова у контрольных животных и у крыс после СНЭ и составляла  $18,7 \pm 2,3$  усл.ед. и  $17,4 \pm 2,2$  усл.ед., соответственно. Распределение свечения после введения ЗФБ в цитоплазме энтероцитов у крыс обеих групп также было равномерным (рис. 3, а,б).

После введения ЗФБ в желудочно-кишечный тракт уже через 20 мин при конфокальной микроскопии была заметна зеленая флюоресценция клеток эпителия проксимальных канальцев. При этом не обнаружено свечения в клетках остальных отделов нефрона. Распределение флюоресценции в цитоплазме клеток проксимального канальца у крыс после СНЭ было неравномерным. Выявлено интенсивное свечение в образованиях округлой формы размером  $0,5-2,0$  мкм. В эпителиоцитах контрольных крыс количество таких образований было больше, и они были равномерно распределены по цитоплазме клеток (рис. 4, а,б).

Интенсивность зеленой флюоресценции возра-

стала в течение нескольких часов после введения ЗФБ, ее максимум отмечен через 5 часов (рис. 5).

## ОБСУЖДЕНИЕ

В просвете желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) при переваривании разнообразных пищевых протеинов образуется огромное количество пептидов и фрагментов белковых молекул. По классическим представлениям основным источником поступления пищевого азота в кишечник млекопитающих являются образовавшиеся в результате гидролиза протеинов свободные аминокислоты, а также небольшие пептиды (преимущественно ди- и трипептиды), которые абсорбируются клетками эпителия кишки, а затем транспортируются в циркуляцию [15-20]. Однако и более крупные пептиды, а также белковые молекулы, находящиеся в просвете ЖКТ даже в небольших количествах (микрограммы), могут подвергаться трансэпителиальному транспорту в тонкой кишке и появляться в циркуляции, вызывая локальные или системные биологические эффекты [21-23]. Хотя возможность эпителиального транспорта более крупных белковых фрагментов снижается по мере увеличения молекулярной массы и длины аминокислотной последовательности [24], подобного рода транцитоз показан для целого ряда белковых молекул – некоторых энзимов [25], бычьего сывороточного альбумина [26], яичного альбумина [27], овальбумина [28], пероксидазы хрена [29,30], иммуноглобулинов [31,32] и некоторых других белков [33-35]. Такие механизмы поступления полипептидов и белков могут иметь существенное значение для организма в связи с возможностью модулировать функции иммунной, эндокринной, нервной, сердечно-сосудистой, а, вероятно, и других систем, как в норме, так и при патологических условиях [22].

Неспецифический и рецептор-опосредованный транцитоз белковых фрагментов и нативных белковых молекул в тонкой кишке изучен недостаточно, хотя известно, что он в существенной степени может определяться холинергическими механизмами, активностью рецептора IgE, стрессом, патологическими изменениями энтероцитов [28, 36-38]. Кроме того, установлено, что в кишке крыс, как и в клетках проксимального сегмента нефрона, экспрессируются мегалин и кубилин [39], которые осуществляют рецептор-опосредованный эндоцитоз различных белков [40-42].

Ранее опубликованные исследования впервые продемонстрировали возможность попадания интактных белковых молекул (на примере желтого флюоресцентного протеина) из просвета кишечника в кровотока с последующей аккумуляцией в поч-

ке [7]. Полученные результаты определенно показывают, что ЗФП также относится к белкам, способным подвергаться трансцитозу в энтероцитах *in toto*. Доказательством этого является обнаружение характерного для ЗФП свечения в энтероцитах и постепенное последующее накопление его в клетках проксимальных канальцев крыс с нормальной функцией почек. Очевидно, быстро попадая в системную циркуляцию, данная молекула белка с относительно небольшой молекулярной массой легко проникает в клубочковый ультрафильтрат и реабсорбируется эпителиоцитами канальцев.

В работе представлены прямые доказательства того, что интактные молекулы всасывающегося в кишке белка могут попадать в клетки проксимального канальца и в условиях развития ренальной дисфункции. При этом процесс кишечного транспорта ЗФП сохраняется в полной мере, поскольку интенсивность флюоресценции данного белка в цитоплазме энтероцитов у них не отличалась от группы контроля (см. рис. 3).

Представляемые экспериментальные данные могут иметь принципиальное значение для понимания влияния количества и состава белковых молекул, поступающих с пищей, на развитие и прогрессирование дисфункции почек. Так, к настоящему времени имеется целый ряд фактов, указывающих на то, что режим белкового питания не безразличен для функционального состояния почек. Развитие альбуминурии ассоциируется с увеличением потребления белка с пищей [43], а гипопротеиновая диета приводит к замедлению темпов прогрессирования ХБП [44]. Однако качественный состав потребляемых протеинов также может оказывать определенное влияние на состояние паренхимы почек. Например, известно, что динамика СКФ в ответ на острую нагрузку белками животного и растительного происхождения существенно различается [45], а назначение соевого белка оказывает благоприятное влияние на прогрессирование экспериментальной ХПН вне зависимости от его суточной дозы [46], что может быть связано со снижением экспрессии TGF-beta – важного фактора развития фиброза в почечной ткани [47]. В контексте полученных данных мы предполагаем, что по крайней мере частично эффекты изменения потребления белка связаны со способностью отдельных белков и (или) крупных пептидов проникать из просвета ЖКТ в циркуляцию, затем в почку и оказывать прямое действие на ее функции.

Морфологические и функциональные данные в группе исследованных нами крыс с СНЭ характеризуют относительно ранние стадии развития экспериментальной хронической дисфункции почек

(почечной недостаточности), поскольку, наряду с явными морфологическими признаками изменений гломерулярной гемодинамики [14,48] и дистрофическими изменениями канальцев, были обнаружены только начальные свидетельства формирования нефросклероза. Вместе с тем, в данном исследовании определенно установлено, что способность почек аккумулировать ЗФП у животных с начальными морфологическими и функциональными признаками ренальной дисфункции после СНЭ, в сравнении со здоровыми животными, существенно ниже.

С одной стороны, обнаруженные различия могут быть связаны с развитием процессов гиперфильтрации в остаточных нефронах после экспериментальной редукции 5/6 почечной паренхимы [14,48]. Гиперфильтрация, в свою очередь, приводит к увеличению транспортной загрузки проксимального отдела нефрона, в том числе и белками с относительно низкой молекулярной массой, что подтверждается существенным нарастанием концентрации альбумина в моче у крыс с СНЭ. Таким образом, можно предположить, что одной из причин снижения накопления ЗФП в клетках проксимальных канальцев является конкуренция за системы реабсорбции белков.

С другой стороны, весьма вероятно, что снижение аккумуляции ЗФП определяется и начальными структурными изменениями эпителиоцитов проксимального отдела нефрона у крыс с экспериментальной ХПН, обнаруженными на светооптическом уровне и при электронной микроскопии (см. рис. 1, 2).

При обсуждении патогенеза ренальной дисфункции редко уделяют внимание неэкскреторным функциям почки, к которым относится выработка физиологически активных веществ, поступающих в системный кровоток, а также поддержание нормального метаболизма углеводов, липидов и белков [49]. Вместе с тем, полученные данные показывают, что при относительно ранних стадиях развития экспериментальной ХПН, когда оставшаяся часть почки довольно успешно справляется с поддержанием ряда важнейших физико-химических констант жидкостей внутренней среды, функция большого органа по всасыванию и обмену белковых молекул уже существенно страдает. Это проявляется в виде снижения реабсорбционной емкости клеток проксимальных канальцев, показанной в модельных экспериментах [50], и подтверждается нашими данными для ЗФБ. Уменьшение содержания альбумина в циркуляции, несмотря на отсутствие протеинурии «нефротического» уровня, может рассматриваться как результат этого про-

цесса (см. табл. 1). В свою очередь, нарушение функции почек по участию в метаболизме белка может иметь значительные последствия для организма, поскольку известно, что снижение концентрации альбумина сыворотки крови (как маркера нарушения белкового обмена) тесно ассоциируется со снижением выживаемости больных с ХБП [51].

Таким образом, модель с применением флюоресцентного белка, впервые использованная в нашей работе у животных с экспериментальной ХПН, позволила показать, что интактные чужеродные белки могут всасываться в ЖКТ, попадать в системный кровоток и в почку, а их накопление в клетках проксимального сегмента нефрона значительно меньше, чем у контрольных животных. Полученные данные открывают новые перспективы для изучения роли почек в белковом метаболизме при развивающейся почечной недостаточности, включая канальцевую реабсорбцию не только эндогенных, но и экзогенных белков, а также обращают внимание на необходимость изучения нарушений важнейших неэскреторных функций почек и их последствий при анализе прогрессирования нефропатий.

*Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект N 05-04-49836), программы «Ведущие научные школы» (проект НШ-6576.2006.4.)*

#### БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Смирнов АВ, Есаян АМ, Каюков ИГ и др. Современные подходы к замедлению прогрессирования хронической болезни почек. *Нефрология* 2004;8 (3): 89-99
2. Remuzzi G. Nephropathic nature of proteinuria. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1999; 8 (6):655-663
3. Наточин ЮВ, Григорьев АИ, Буравкова ЛБ и др. Антидиуретическая реакция почек человека и крысы при пероральном введении аргинин-вазопрессина и десмопрессина. *Рос физиол журн им И.М.Сеченова* 2003; 89 (2): 184-192
4. Natochin YuV, Reznik LV, Bakcheteeva VT, Lavrova EA. Renal function and renal platinum content in uninephrectomized rats following cisplatin administration. *Renal Failure* 1993; 15(2):157-162
5. Brown D, McCluskey RT, Ausiello DA. The cell biology of Heymann nephritis: a model of human membranous glomerulonephritis. *Am J Kidney Dis* 1987;10(1):74-76
6. Dubois EL, Horowitz RE, Demopoulos HB, Teplitz R. NZB/NZW mice as a model of systemic lupus erythematosus. *JAMA* 1966; 24;195(4):285-289
7. Бурмакин МВ, Селиверстова ЕВ, Наточин ЮВ. Накопление желтого флюоресцентного белка в почке после его всасывания в кишечнике у крыс. *Рос физиол ж им. И.М. Сеченова* 2005; 91: 1195-1204
8. Tsien RY. The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem* 1998; 67: 509-544
9. Ormrod D, Miller T. Experimental uremia. Description of a model producing varying degrees of stable uremia. *Nephron* 1980; 26(5): 249-254
10. Schwartz MM, Bidani AK, Lewis EJ. Glomerular epithelial cell function and pathology following extreme ablation of renal mass. *Am J Pathol* 1987;126(2): 315-324
11. Schwartz MM, Bidani AK. Role of glomerular epithelial cell injury in the pathogenesis of glomerular scarring in the rat remnant kidney model. *Am J Physiol* 1993; 265(3pt2): 391-398
12. Lillie RD. *Histopathologic Technic and Pracrical*

*Histochemistry*, 3-edition, McGraw-Hill Book Company, New-York, 1965; 65-75

13. Young B, Heath JW. *Uriunary System*. Churchill Livingstone, *Wheather's Functional Histology*, 4-th edition. Edinbourgh, 2004: 286-310
14. Floege J, Burne MW, Alpers CE et al. Glomerular cell proliferation and PFG expression precede glomerulosclerosis in the remnant kidney model. *Kidney Int* 1992; 42: 297-309
15. Webb KE Jr. Intestinal absorption of protein hydrolysis products: a review. *J Anim Sci* 1990;68(9):3011-3022
16. Adibi SA. Renal assimilation of oligopeptides: physiological mechanisms and metabolic importance. *Am J Physiol* 1997; 272(5, Pt. 1): E723-E736
17. Caspary WF. Physiology and pathophysiology of intestinal absorption. *Am J Clin Nutrition* 1992; 55 [Suppl 1]: 299S-308S
18. Conigrave AD, Young JA. Function of intestine. In: R.Greger, U.Windhorst (eds.) *Comprehensive Human Physiology: from Cellular Mechanisms to Integration*. Vol. 2. Springer, Berlin, 1996;259-1287
19. Leibach FH, Ganapathy V. Peptide transporters in the intestine and the kidney. *Annu Rev Nutr* 1996; 16: 99-119
20. Shimizu M. Food-derived peptides and intestinal functions. *Biofactors* 2004; 21(1-4):43-47
21. Наточин ЮВ, Пруцкова НП, Шахматова ЕИ и др. Исследование возможности всасывания интактных нанопептидов в изолированной тонкой кишке in vivo. *ДАН* 2003, 388 (4): 558-651
22. Zaloga GP, Siddiqui RA. Biologically active dietary peptides. *Mini Rev Med Chem* 2004;4(8):815-821
23. Hayashida K, Takeuchi T, Shimizu H et al. Bovine lactoferrin has a nitric oxide-dependent hypotensive effect in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004;286(2):R359-365
24. Roberts PR, Burney JD, Black KW, Zaloga GP. Effect of chain length on absorption of biologically active peptides from the gastrointestinal tract. *Digestion* 1999;60(4):332-337
25. Cloutier M, Gingras D, Bendayan M. Internalization and transcytosis of pancreatic enzymes by the intestinal mucosa. *J Histochem Cytochem* 2006;54(7):781-94
26. Kimm MH, Curtis GH, Hardin JA, Gall DG. Transport of bovine serum albumin across rat jejunum: role of the enteric nervous system. *Am J Physiol* 1994; 266 (Gastrointest. Liver Physiol. 29): G186-G193
27. Crowe SE, Soda K, Stanis AM, Perdue MH. Intestinal permeability in allergic rats: nerve involvement in antigen-induced changes. *Am J Physiol* 1993; 264 (Gastrointest. Liver Physiol. 27): G617-G623
28. Kersting S, Bruewer M, Schuermann G et al. Antigen transport and cytoskeletal characteristics of a distinct enterocyte population in inflammatory bowel diseases. *Am J Pathol* 2004;165(2):425-37
29. Bijlsma PB, Kiliaan AJ, Scholten G et al. Carbachol but not forskolin can increase mucosal-to-serosal transport of intact protein in rat ileum in vitro. *Am J Physiol* 1996; 271 (Gastrointest. Liver Physiol. 34): G147-G155
30. Kiliaan AJ, Saunders PR, Bijlsma PB et al. Stress stimulates transepithelial macromolecular uptake in rat jejunum. *Am J Physiol* 1998;275(5 Pt 1):G1037-1044.
31. Dickenson BL, Badizadegan K, Wu Z et al. Bidirectional FcRn-dependent IgG transport in a polarized human intestinal epithelial cell line. *J Clin Invest* 1999; 104: 903-911
32. Mostov KE. Transepithelial transport of immunoglobulins. *Annu Rev Immunol* 1994;12: 63-84
33. Talukder MJR, Takeuchi T, Harada E. Transport of colostral macromolecules into the cerebrospinal fluid via plasma in newborn calves. *J Dairy Sci* 2002; 85: 514-524
34. Harada E, Itoh Y, Saitzyo K et al. Characteristic transport of lactoferrin from the intestinal lumen into the bile via the blood in piglets. *Comparative Biochem Physiol* 1999; 124 A: 321-327
35. Gonnella PA, Siminoski K, Murphy RA & Neutra MR. Transepithelial transport of epidermal growth factor by absorptive cells of suckling rat ileum. *J Clin Invest* 1987; 80: 22-32

36. Bevilacqua C, Montagnac G, Benmerah A et al. Food allergens are protected from degradation during CD23-mediated transepithelial transport. *Int Arch Allergy Immunol* 2004;135(2):108-116
37. Yu LC, Montagnac G, Yang PC et al. Intestinal epithelial CD23 mediates enhanced antigen transport in allergy: evidence for novel splice forms. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;285(1):G223-234
38. Kiliaan AJ, Saunders PR, Bijlsma PB et al. Stress stimulates transepithelial macromolecular uptake in rat jejunum. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 1998;275:G1037-G1044
39. Yammani RR, Seetharam S, Seetharam B. Cubilin and megalin expression and their interaction in the rat intestine: effect of thyroidectomy. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001;281:E900-E907
40. Christensen EI, Birn H. Megalin and cubilin: synergistic endocytic receptors in renal proximal tubule. *Am J Physiol* 2001;280:F262-F273
41. Hammand SM, Barth JL, Knaak C, Argraves WS. Megalin acts in concert with cubilin to mediate endocytosis of high density lipoproteins. *J Biol Chem* 2000;275:12003-12008
42. Leheste JR, Rolinski B, Vorum H. Megalin knockout mice as an animal model of low molecular weight proteinuria. *Am J Pathol* 1999;155:1361-1370
43. Toeller M, Buyken AE. Protein intake—new evidence for its role in diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 1998;13(8):1926-1927
44. Pedrini MT, Levey AS, Lau J et al. The effect of dietary protein restriction on the progression of diabetic and nondiabetic renal diseases: a meta-analysis. *Ann Intern Med* 1996;124(7):627-632
45. Кучер АГ, Есаян АМ, Шишкина ЛИ и др. Влияние нагрузок растительным и животным белком на функциональное состояние почек у здоровых людей. *Нефрология* 1997;1(2):79-84
46. Dobronravov V, Smirnov A, Parastaeva M et al. Influence of low- and high-soy protein diet on the progression of experimental chronic renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 2005;20 [Suppl 5]: 70
47. Fukui M, Nakamura T, Ebihara I et al. Low-protein diet attenuates increased gene expression of platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta in experimental glomerular sclerosis. *J Lab Clin Med* 1993;121(2):224-234
48. Zatz R, Brenner BM. Pathogenesis of diabetic microangiopathy. The hemodynamic view. *Am J Med* 1986;80(3):443-453
49. Наточин ЮВ. Физиология почки. В: *Физиология водно-солевого обмена и почки*. СПб.: Наука, 1993; 202-416
50. Gekle M, Mildenerger S, Freudinger R, Silberagl S. Long-term protein exposure reduces albumin binding and uptake in proximal tubule-derived opossum kidney cells. *J Am Soc Nephrol* 1998;9(6):960-968
51. Fung F, Sherrard DJ, Gillen DL et al. Increased risk for cardiovascular mortality among malnourished end-stage renal disease patients. *Am J Kidney Dis* 2002;40(2):307-314

Поступила в редакцию 4.12.2006 г.

Принята в печать 20.12.2006 г.