

УДК 616.34-002+576.311.335+611.341+612.397.22+579.2+577.112.856

СТРОЕНИЕ КОМПАРТМЕНТОВ ТРАНСЦИТОЗА ЭНТЕРОЦИТОВ ПРИ АБСОРБЦИИ ЛИПИДОВ

© Наталья Рафаиловна Карелина¹, Иван Добромиров Димов¹,
Ирина Сергеевна Сесорова², Анна Валерьевна Зайцева¹, Линард Юрьевич Артюх¹,
Галина Николаевна Денисова¹, Александр Александрович Миронов³

¹ Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет.
194100, Санкт-Петербург, Литовская ул., д. 2

² Ивановская государственная медицинская академия. 153012, г. Иваново, Шереметевский пр., д. 8

³ Лаборатория электронной микроскопии Института молекулярной онкологии, г. Милан, Италия

Контактная информация: Наталья Рафаиловна Карелина — д.м.н, профессор, заведующая кафедрой анатомии человека. E-mail: karelina_nr@mail.ru

Поступила: 09.02.2021

Одобрена: 17.03.2021

Принята к печати: 24.03.2021

РЕЗЮМЕ: Исследован трансцитоз липидов в энтероцитах взрослых крыс. Комплекс Гольджи находился в нетранспортном состоянии и содержал много пузырьков, но не имел межцистернальных связей, типичных цис-моста и транс-моста цистерн. После добавления липидов в форме химуса пре-хиломикроны первоначально были обнаружены в канальцах гладкого эндоплазматического ретикулума, прикрепленных к базолатеральной плазмалемме ниже пояса, состоящего из адгезивных соединений, всегда связанных с другими цистернами. Перегрузка энтероцитов липидами приводила к накоплению липидных капель, увеличению диаметра хиломикронов и переходу комплекса Гольджи в транспортное состояние с образованием межцистернальных связей, прикреплению цис- и транс-цистерн и исчезновению пузырьков. Эти данные обсуждаются с функциональной точки зрения. Несмотря на огромный прогресс в расшифровке молекулярных механизмов, участвующих во внутриклеточном транспорте в культуре клеток и в пробирке, многие аспекты этого процесса *in situ* остаются неясными.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: энтероцит; комплекс Гольджи; трансцитоз; хиломикроны.

STRUCTURE OF ENTEROCYTE TRANSCYTOSIS COMPARTMENTS DURING LIPID ABSORPTION

© Natalia R. Karelina¹, Ivan D. Dimov¹, Irina S. Sesorova², Anna V. Zaitseva¹,
Linard Yu. Artyukh¹, Galina N. Denisova¹, Alexander A. Mironov³

¹ Saint-Petersburg State Pediatric Medical University. 194100, Russia, Saint-Petersburg, Litovskaya str., 2

² Ivanovo State Medical Academy. 153012, Ivanovo, Sheremetyevo av., 8

³ The FIRC Institute of Molecular Oncology, 20139

Contact information: Natalia R. Karelina — MD, Professor, Head of the Department of Human Anatomy.
E-mail: karelina_nr@mail.ru

Received: 09.02.2021

Revised: 17.03.2021

Accepted: 24.03.2021

ABSTRACT: Transcytosis of lipids in adult rat enterocytes was studied. The Golgi was in a non-transportable state and contained many bubbles, but did not have the inter-cistern connections typical of cis-bridge and trans-bridge cisterns. After the addition of lipids in the form of chyme, the pre-chylomicrons were initially found in the tubules of the smooth endoplasmic reticulum attached to the basolateral plasmalemma below the girdle, consisting of adhesive compounds always connected to other cisterns. The overload of enterocytes with lipids led to the accumulation of lipid droplets, an increase in the diameter of chylomicrons, and the transition of the Golgi complex to a transport state with the formation of intercisternal bonds, the attachment of cis- and trans-cisterns, and the disappearance of vesicles. This data is discussed from a functional point of view. Despite enormous progress in deciphering the molecular mechanisms involved in intracellular transport in cell culture and *in vitro*, many aspects of this *in situ* process remain unclear.

KEY WORDS: enterocyte; Golgi complex; transcytosis; chylomicrons.

ВВЕДЕНИЕ

Знания о механизмах липидного транскитоза через энтероциты важны для понимания патогенеза различных кишечных заболеваний и атерогенеза. В кишечнике свободные жирные кислоты, холестерин и димоноглицериды образуются после гидролиза липидов, а затем подвергаются транскитозу. Образуются мицеллы, содержащие желчные кислоты и свободные жирные кислоты. Согласно нынешнему консенсусу, транскитоз липидов через энтероциты происходит с помощью хиломикронов [2, 18, 19]. Хиломикроны содержат нейтральные липиды в ядре и полярные липиды вместе с аполипопротеинами (в основном ApoB) на своей поверхности [10, 19]. Липиды поглощаются энтероцитами через белок Niemann-Pick C1-like 1 [3, 4]. Апикальная плазматическая мембрана микроворсинок содержит CD36 — белок, который может транспортировать свободные жирные кислоты. Удаление CD36 из генома резко снижает способность энтероцитов транспортировать липиды [12].

Было обнаружено, что маркировка ApoB в гранулярном эндоплазматическом ретикулуме значительно снижается через 5 минут после инфузии жира в просвет кишечника. Сильная маркировка наблюдалась в профилях гладкого эндоплазматического ретикулума [20]. Сборка пре-хиломикронов в ретикулуме регулируется микросомальным белком-переносчиком триглицеридов [20]. В комплексе Гольджи пре-хиломикроны подвергаются гликозилированию и становятся хиломикронами. В энтероцитах комплекс Гольджи имеет типичную структуру. Он расположен рядом с ядром [17]. У голодных животных мечение ApoB наблюдалось в надъядерных областях энтероцитов.

ApoB обычно присутствует в области комплекса Гольджи, где ApoB подвергается гликозилированию. Его липидный состав изменяется, и частица приобретает ApoAI [7]. Везикулы, выделенные из кишечных комплексов Гольджи, содержали либо хиломикроны, либо (редко) липопротеины очень низкой плотности, но не вместе [12]. Цистерны комплекса Гольджи также были помечены для ApoB, особенно их расширенные концы (растяжения) этих цистерн. Мало что известно о механизмах транспорта хиломикронов внутри аппарата Гольджи и их выходе из него [16]. Неясно, как хиломикроны концентрируются возле базальной мембраны и проходят через нее. Информация о клеточных механизмах транскитоза хиломикронов весьма скудна. Более того, доступная информация была получена в основном *in vitro*, тогда как в тканях прохождение липидов через энтероциты исследовали только после значительной перегрузки этих клеток. Неясно также, транспортируются ли хиломикроны внутри COPII-зависимых мегавезикул, подвергаются ли хиломикроны концентрации во время транспорта внутри комплекса Гольджи, каков механизм доставки хиломикронов из пространства между энтероцитами в пределах интердигитальных контактов в направлении интерстиция. Здесь мы исследовали транскитоз липидов через энтероциты с использованием современных подходов электронной микроскопии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Использовались 20 крыс-самцов линии Sprague Dawley и 25 шестимесячных крыс линии Wistar (из Кардиологического центра в Москве, Россия; средняя масса тела была

равна 215 ± 5 и 231 ± 8 г соответственно; с учетом минимального использования животных для подтверждения результатов), которые были голодны в течение 24 часов с неограниченным количеством воды в индивидуальных клетках с полом из проволочной сетки.

В лабораторных комплексах животные содержались в пластиковых клетках с опилками, с циклом 12 ч / темнота / свет, при комнатной температуре и кормлении стандартным гранулированным кормом для крыс и водой. Во всех экспериментах крысы были сопоставлены по возрасту (6 месяцев) и полу (самцы). Химус, образовавшийся в начальной части тощей кишки крысы, получавшей корм, отбирали шприцем через 30 мин после этого кормления и помещали в одну пробирку.

Для электронно-микроскопической томографии последовательные срезы длиной 200 нм выделяли на ультрамикротоме EM-UC6 (Leica Microsystems) с помощью алмазного ножа (Diatome, Биль, Швейцария) [5, 6]. Вкратце: ленты срезов переносили на покрытые формваром сетки с пазами 1×2 мм. Частицы коллоидного золота (10 нм) помещали на обе поверхности сетки, чтобы они служили маркерами для последующего совмещения изображений. Сетки были получены в просвечивающем электронном микроскопе Tecnai-20 (Thermo Fisher, Эйндховен, Нидерланды), работающем при 200 кэВ. Наклоны по одной оси серии были получены автоматически с изображениями, полученными с шагом 1° , более $\pm 65^\circ$ относительно ортогональных осей. Томограммы были рассчитаны, проанализированы и сегментированы с использованием программного пакета IMOD, как это было описано G.V. Beznoussenko и соавт. (2016).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для анализа транцитоза использовали химус, содержащий желчные кислоты, холестерин и свободные жирные кислоты для синхронизации транцитоза липидов. Обычно используемые растворы свободных жирных кислот [19] не содержат холестерина и желчных кислот, что замедляет их потребление. Хиломикроны концентрировались на поперечной стороне стопки комплекса Гольджи. Во время их прохождения через аппарат Гольджи количество хиломикронных внутри одного цистернального вздутия увеличилось почти в $5,3 \pm 1,1$ раза. После секреции хиломикронных в межклеточное пространство на

уровне замковых контактов эти частицы собираются около базальной мембраны и затем проходят через ее поры в интерстиций. После добавления неразбавленного химуса капли липидов были обнаружены в цитоплазме энтероцитов. Не были найдены выходные ворота из эндоплазматического ретикулума и доказательства в пользу апикального эндоцитоза. Комплекс Гольджи был перегружен хиломикронами. Размер хиломикронных увеличился. После перегрузки комплекса Гольджи хиломикронами ряды пор между растяжениями и цистернами стали менее заметными, а уровень концентрации хиломикронных на транс-стороне комплекса Гольджи увеличился. Крупные хиломикроны появлялись внутри широкого межклеточного пространства между энтероцитами. Липидные капли в цитоплазме стали больше, и эти большие хиломикроны появились в интерстиции (наши неопубликованные наблюдения). Таким образом, после добавления большого количества липидов в виде химуса мы обнаружили накопление липидных гранул и перегрузку комплекса Гольджи и интерстиция.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Перегрузка энтероцита липидами привела к накоплению липидной капли [4, 12], увеличению размера хиломикронных, ингибированию доставки хиломикронных в интерстиций и изменению структуры комплекса Гольджи. Наши данные хорошо согласуются с материалом, приведенным в литературе [2, 5, 6, 15]. Действительно, было доказано, что после кормления жиром увеличивается размер, но не количество хиломикронных, продуцируемых тонкой кишкой [11]. Наблюдаются также липидные капли в растяжении гладкой эндоплазматической сети, которая расположена ниже концевых перепонок актина в энтероцитах тонкого кишечника хомяков, получающих липиды [8, 9]. Расширенные цистерны комплекса Гольджи, заполненные многочисленными липидными частицами в их просвете, наблюдаются и в энтероцитах карпа после введения арахисового масла в просвет кишечника. Большие липидные гранулы также накапливались в цитозоле базальных частей энтероцитов [14, 15]. Наконец, сравнение наших изображений с изображениями, представленными S.M. Sabesin, S. Frase (1977) и P. Tso, J.A. Balint (1986) предполагает, что энтероциты, показанные авторами статей, были перегружены липидами. Важно отметить, что

перегрузка комплекса Гольджи может изменить правильность гликозилирования белков [1, 13, 15].

Наш анализ выявил неизвестные ранее механизмы трансцитоза через энтероциты. Мы понимаем, что наш морфологический анализ не может подтвердить модель, но он может опровергнуть конкретную модель, если есть наблюдение, которое должно быть запрещено согласно нашей модели. Таким образом, отсутствие выходных ворот из ретикулума и мегапочек, покрытых СОРІІ, позволило нам рассматривать, что везикулярная и мегавезикулярная модель транспорта «эндоплазматический ретикулум — комплекс Гольджи» маловероятна (по крайней мере, в энтероцитах взрослых крыс). Сходным образом несовместимость размеров хиломикрон и внутреннего объема СОРІ везикул, концентрация хиломикрон во время транспорта внутри комплекса Гольджи ставят под сомнение везикулярные и цистерные модели созревания-прогрессии транспорта внутри комплекса Гольджи.

ЛИТЕРАТУРА

1. Зайчик А.Ш., Чурилов Л.П. Патохимия (Эндокринно-метаболические нарушения). Патологическая физиология в 3 томах. Патохимия. Издание 3-е, дополненное и исправленное. СПб.: ЭЛБИ-СПб. 2007; 2.
2. Димов И., Кашин А., Здорикова М. и др. Механизмы транспорта липидов через энтероцит кишечной ворсинки. *Russian Biomedical Research*. 2020; 5(2): 24–30.
3. Листопадава А., Бурцева Т., Уразгалиева И., Новикова В. Заболевания желудочно-кишечного тракта и синдром избыточного бактериального роста у детей. *Медицина: теория и практика*. 2018; 3(1): 57.
4. Benito-Vicente A., Uribe K.B., Jebari S. et al. Familial Hypercholesterolemia: The Most Frequent Cholesterol Metabolism Disorder Caused Disease. *Int J Mol Sci*. 2018; 19: E3426
5. Beznoussenko G.V., Pilyugin S.S., Geerts W.J. et al. Trans-membrane area asymmetry controls the shape of cellular organelles. *Int J Mol Sci*. 2015; 16(3): 5299–5333.
6. Beznoussenko G.V., Ragnini-Wilson A., Wilson C., Mironov A.A. Three-dimensional and immune electron microscopic analysis of the secretory pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Histochem Cell Biol*. 2016; 146(5): 515–27.
7. Black D.D. Development and physiological regulation of intestinal lipid absorption. I. Development of intestinal

- lipid absorption: cellular events in chylomicron assembly and secretion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2007; 293: 519–24.
8. Buschmann R.J., Manke D.J. Morphometric analysis of the membranes and organelles of small intestinal enterocytes I. Fasted hamster. *J Ultrastruct Res*. 1981a; 76: 1–14.
9. Buschmann R.J., Manke D.J. Morphometric analysis of the membranes and organelles of small intestinal enterocytes. II lipid-fed hamster. *J Ultrastruct Res*. 1981b; 76: 15–26.
10. Giammanco A., Cefalù A.B., Noto D., Aversa M.R. The pathophysiology of intestinal lipoprotein production. *Front Physiol*. 2015; 6: 61.
11. Hayashi H., Fujimoto K., Cardelli J.A., Nutting D.F., Bergstedt S., Tso P. Fat feeding increases size, but not number, of chylomicrons produced by small intestine. *Am J Physiol*. 1990; 259: G709–19.
12. Mansbach C.M. 2nd, Siddiqi S. Control of chylomicron export from the intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2016; 310: G659–668.
13. Marra P., Salvatore L., Mironov A. Jr. et al. The biogenesis of the Golgi ribbon: the roles of membrane input from the ER and of GM130. *Mol Biol Cell*. 2007; 18: 1595–1608.
14. Noaillac-Depeyre J., Gas N. Fat absorption by the enterocytes of the carp (*Cyprinus carpio* L.) *Cell Tissue Res*. 1974; 155: 353–65.
15. Denisova G.N., Dimov I.D., Zaitseva A.V. et al. Overloading of differentiated Caco-2 cells during lipid transcytosis induces glycosylation mistakes in the Golgi complex. *Biocell*. 2021; 45(3): 773–83. DOI: 10.32604/biocell.2021.014233.
16. Pavelka M., Gangl A. Effects of colchicine on the intestinal transport of endogenous lipid. *Gastroenterology*. 1985; 84: 544–55.
17. Pavelka M., Roth J. *Functional ultrastructure Atlas of tissue biology and pathology*. Springer, Wien. 2005.
18. Sabesin S.M., Frase S. Electron microscopic studies of the assembly, intracellular transport, and secretion of chylomicrons by rat intestine. *J Lipid Res*. 1977; 18: 496–511.
19. Santos A.J., Nogueira C., Ortega-Bellido M., Malhotra V. TANGO1 and Mia2/cTAGE5(TALI) cooperate to export bulky pre-chylomicrons/VLDLs from the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol*. 2016; 213: 343–54.
20. Tso P., Balint J.A. Formation and transport of chylomicrons by enterocytes to the lymphatics. *Am J Physiol*. 1986; 250: G715–26.

REFERENCES

1. Zaychik A.Sh., Churilov L.P. Patokhimiya (Endokrinno-metabolicheskiye narusheniya). [Patokhimiya (disturbi endocrino-metabolici)]. *Patologicheskaya fiziologiya v 3 tomakh. Patokhimiya. Izdaniye 3-ye, dopolnennoye i ispravlennoye*. SPb.: ELBI-SPb Publ. 2007; 2. (in Russian)

2. Dimov I., Kashin, A., Zdorikova M. i dr. Mekhanizmy transporta lipidov cherez enterocit kischechnoj vorsinki [Mechanisms of lipid transport through the enterocyte of the intestinal villi]. Russian Biomedical Research. 2020; 5(2): 24–30 (in Russian)
3. Listopadova A., Burceva T., Urazgalieva I., Novikova V. Zabolevaniya zheludochno-kishechnogo trakta i sindrom izbytochnogo bakterial'nogo rosta u detej [Diseases of the gastrointestinal tract and the syndrome of excessive bacterial growth in children]. Medicina: teoriya i praktika. 2018; 3(1): 57 (in Russian)
4. Benito-Vicente A., Uribe K.B., Jebari S. et al. Familial Hypercholesterolemia: The Most Frequent Cholesterol Metabolism Disorder Caused Disease. Int J Mol Sci. 2018; 19: E3426
5. Beznoussenko G.V., Pilyugin S.S., Geerts W.J. et al. Trans-membrane area asymmetry controls the shape of cellular organelles. Int J Mol Sci. 2015; 16(3): 5299–5333.
6. Beznoussenko G.V., Ragnini-Wilson A., Wilson C., Mironov A.A. Three-dimensional and immune electron microscopic analysis of the secretory pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. Histochem Cell Biol. 2016; 146(5): 515–27.
7. Black D.D. Development and physiological regulation of intestinal lipid absorption. I. Development of intestinal lipid absorption: cellular events in chylomicron assembly and secretion. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2007; 293: 519–24.
8. Buschmann R.J., Manke D.J. Morphometric analysis of the membranes and organelles of small intestinal enterocytes I. Fasted hamster. J Ultrastruct Res. 1981a; 76: 1–14.
9. Buschmann R.J., Manke D.J. Morphometric analysis of the membranes and organelles of small intestinal enterocytes. II lipid-fed hamster. J Ultrastruct Res. 1981b; 76: 15–26.
10. Giammanco A., Cefalù A.B., Noto D., Aversa M.R. The pathophysiology of intestinal lipoprotein production. Front Physiol. 2015; 6: 61.
11. Hayashi H., Fujimoto K., Cardelli J.A., Nutting D.F., Bergstedt S., Tso P. Fat feeding increases size, but not number, of chylomicrons produced by small intestine. Am J Physiol. 1990; 259: G709–19.
12. Mansbach C.M. 2nd, Siddiqi S. Control of chylomicron export from the intestine. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2016; 310: G659–668.
13. Marra P., Salvatore L., Mironov A.Jr. et al. The biogenesis of the Golgi ribbon: the roles of membrane input from the ER and of GM130. Mol Biol Cell. 2007; 18: 1595–1608.
14. Noaillac-Depeyre J., Gas N. Fat absorption by the enterocytes of the carp (*Cyprinus carpio* L.) Cell Tissue Res. 1974; 155: 353–65.
15. Denisova G.N., Dimov I.D., Zaitseva A.V. et al. Overloading of differentiated Caco-2 cells during lipid transcytosis induces glycosylation mistakes in the Golgi complex. Biocell. 2021; 45(3): 773–83. DOI: 10.32604/biocell.2021.014233.
16. Pavelka M., Gangl A. Effects of colchicine on the intestinal transport of endogenous lipid. Gastroenterology. 1985; 84: 544–55.
17. Pavelka M., Roth J. Functional ultrastructure Atlas of tissue biology and pathology. Springer, Wien. 2005.
18. Sabesin S.M., Frase S. Electron microscopic studies of the assembly, intracellular transport, and secretion of chylomicrons by rat intestine. J Lipid Res. 1977; 18: 496–511.
19. Santos A.J., Nogueira C., Ortega-Bellido M., Malhotra V. TANGO1 and Mia2/cTAGE5(TALI) cooperate to export bulky pre-chylomicrons/VLDLs from the endoplasmic reticulum. J Cell Biol. 2016; 213: 343–54.
20. Tso P., Balint J.A. Formation and transport of chylomicrons by enterocytes to the lymphatics. Am J Physiol. 1986; 250: G715–26.