На правах рукописи

Фальчук
Евгений Леонидович

ИЗУЧЕНИЕ БАРЬЕРНЫХ СВОЙСТВ ФОЛЛИКУЛ-АССОЦИИРОВАННОГО ЭПИТЕЛИЯ ПЕЙЕРОВЫХ БЛЯШЕК ТОНКОЙ КИШКИ КРЫСЫ

03.03.01 – физиология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург
2016

Работа выполнена на кафедре общей физиологии биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет»

Научный руководитель: **Марков Александр Георгиевич**,
доктор биологических наук, профессор

Официальные оппоненты: **Пруцкова Наталья Павловна**,
доктор биологических наук, старший научный сотрудник, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова, ведущий научный сотрудник лаборатории физиологии почки и водно-солевого обмена

Кокряков Владимир Николаевич,
доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт экспериментальной медицины», руководитель лаборатории Общей патологии

Ведущее учреждение: Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Ярославский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации, Ярославль, Россия

Защита состоится « » _____ 2016 г. в ____ часов на заседании Диссертационного совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д002.020.01 при ФГБУН Институт физиологии им И.П. Павлова РАН по адресу: 199034, Санкт-Петербург, наб. Макарова, д.6

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБУН Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН (Санкт-Петербург, наб. Макарова, д. 6) и на сайте института http://www.infran.ru

Автореферат разослан « » _____ 2016 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета: **Ордян Наталья Эдуардовна**, доктор биологических наук

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Изучение механизмов функционирования тканевых барьеров и их роли в регуляции постоянства внутренней среды представляет собой актуальную проблему современной физиологии висцеральных систем. Основной структурой тканевых барьеров является слой эпителиальных клеток, объединенных в единый функциональный пласт с помощью межклеточных соединений, среди которых именно плотные контакты определяют проницаемость межклеточного пути (Günzel and Fromm, 2012). Тканевые барьеры регулируют транспорт ионов, воды и молекул между внешней и внутренней средой и предотвращают транслокацию патогенных структур в организм. Показано, что нарушение проницаемости эпителиального слоя в результате дисфункции комплекса плотных контактов может приводить к развитию воспалительных процессов и аллергий (Barmeyer et al., 2015).

Тканевой барьер, сформированный эпителиальным слоем слизистой оболочки кишечного тракта, подвергается постоянной антигенной нагрузке. Расположенная в стенке кишки лимфоидная система, ассоциированная со слизистой, обеспечивает развитие иммунной реакции в ответ на проникновение патогенных вирусов и бактерий и одновременно поддерживает иммунологическую толерантность по отношению к компонентам пищи и комменсальным бактериям (Mowat, 2003). Основным элементом иммунной системы кишечника являются Пейеровы бляшки – сгруппированные лимфоидные фолликулы, покрытые со стороны полости кишки фолликул-ассоциированным эпителием (Jung et al., 2010).

В составе фолликул-ассоциированного эпителия наряду с энтероцитами имеются специализированные М-клетки, главной функцией которых является перенос антигенных структур по трансцеллюлярному пути из просвета кишки к расположенным ниже иммунным клеткам (Owen and Jones, 1974; Sakhon et al., 2015). В литературе также имеются данные о роли субэпителиальных дендритных клеток, отростки которых проникают по парацеллюлярному пути между энтероцитами, таким образом, представляя альтернативный способ захвата и переноса бактерий через эпителиальный барьер (Rescigno et al., 2001).

Нельзя исключать проникновение антигенов пищи или патогенов микробиоты кишки по межклеточному пути. Некоторые авторы предполагают, что апоптоз эпителиоцитов фолликул-ассоциированного эпителия и исчезновение барьерных свойств этой структуры способствует проникновению микроорганизмов по парацеллюлярному пути (Tamagawa et al., 2003). Однако данному предположению противоречат сведения о

том, что в тонкой кишке кролика Пейеровы бляшки характеризуются большим трансэпителиальным сопротивлением, по сравнению с расположенным рядом участком кишки, покрытым ворсинками (Brayden and Baird, 1994). До настоящего времени остается неясным, является ли данная особенность барьерных свойств фолликул-ассоциированного эпителия Пейеровых бляшек характерной только для кролика или существует и у других видов животных. Кроме этого, известно, что Пейеровы бляшки отличаются по структуре и клеточному составу от участков стенки кишки с ворсинками (Neutra et al., 2001). Возможно, что увеличение трансэпителиального сопротивления Пейеровых бляшек связано не с уменьшением проницаемости фолликул-ассоциированного эпителия, а с особенностями субэпителиального клеточного состава. Таким образом, электрофизиологические параметры, отражающие барьерные свойства фолликул-ассоциированного эпителия Пейеровых бляшек кишки, остаются до настоящего времени не исследованными.

Молекулярными компонентами плотных контактов, которые определяют парацеллюлярную проницаемость эпителиального пласта, являются белки семейства клаудина (Günzel and Fromm, 2012). Установлено, что распределение представителей данного семейства в эпителии различных сегментов кишки совпадает с их барьерными свойствами (Markov et al., 2010). Данные о наличии и распределении клаудинов в фолликул-ассоциированном эпителии Пейеровых бляшек немногочисленны. С помощью иммуногистохимии в фолликул-ассоциированном эпителии Пейеровых бляшек кишки мыши показана локализация клаудина-2, -3 и -4 (Tamagawa et al., 2003), однако информация об уровне данных белков и наличии остальных представителей семейства клаудина в этом эпителии отсутствует.

Известно, что отдельные представители белков плотных контактов, например, клаудин-2 (Liu et al., 2013), а также клаудин-3 и клаудин-4 (Katahira et al., 1997; Sonoda, 1999), обеспечивают трансэпителиальный перенос антигенных структур, выступая в качестве их рецепторов. Изменение количества и локализации других белков семейства, клаудина-5 и клаудина-8, приводит к развитию воспалительных заболеваний кишечника (Zeissig et al., 2007). Таким образом, проведение комплексного анализа барьерных свойств фолликул-ассоциированного эпителия и плотных контактов, в частности, на основе различных методов является необходимым для определения его роли в обеспечении антигенного гомеостаза в кишечнике.

Таким образом, **целью** данной работы является изучение барьерных характеристик фолликул-ассоциированного эпителия Пейеровых бляшек и проведение сравнительного анализа с барьерными характеристиками эпителия ворсинок тощей кишки.

Задачи исследования:

1. Изучение электрофизиологических характеристик фолликул-ассоциированного эпителия Пейеровых бляшек тонкой кишки и сравнение их с электрофизиологическими характеристиками эпителия ворсинок тощей кишки.
2. Исследование проницаемости фолликул-ассоциированного эпителия Пейеровых бляшек для макромолекул различной молекулярной массы в сравнении с проницаемостью эпителия ворсинок, расположенного рядом.
3. Определение уровня белков плотных контактов в фолликул-ассоциированном эпителии Пейеровых бляшек тощей кишки и сравнение с уровнем в эпителии ворсинок, расположенным рядом.
4. Анализ локализации белков плотных контактов в фолликул-ассоциированном эпителии Пейеровых бляшек тощей кишки и в эпителии ворсинок, расположенным рядом.

Научная новизна. Впервые для исследования барьерных свойств эпителия Пейеровых бляшек тощей кишки крысы был применен комплексный подход, сочетающий в себе электрофизиологические, молекулярно-биологические и иммунохимические методы. В результате проведенного исследования получены новые данные о том, что для ткани Пейеровых бляшек тощей кишки крысы характерно бóльшее по сравнению с эпителием ворсинок тощей кишки трансэпителиальное, субэпителиальное и эпителиальное сопротивление. Впервые показано, что в основе различных барьерных свойств исследуемых тканей лежит сниженная проницаемость парацеллюлярного пути фолликул-ассоциированного эпителия для макромолекул. Получены принципиально новые данные о белковом составе плотных контактов эпителия Пейеровых бляшек. Новыми и оригинальными являются данные о том, что уровень отдельных представителей семейства белка клаудина в эпителии Пейеровых бляшек отличается по сравнению с расположенным рядом эпителием ворсинок. Впервые определена локализация белков клаудинов в фолликул-ассоциированном эпителии Пейеровых бляшек тощей кишки крысы.

Теоретическая и практическая значимость работы. Исследование направлено на изучение фундаментальной проблемы физиологии висцеральных систем – роли тканевых барьеров в формировании и сохранении постоянства внутренней среды организма, в частности, сохранении антигенного гомеостаза в организме. Полученные в ходе работы данные расширяют представление о механизмах функционирования Пейеровых бляшек, основного элемента лимфоидной системы слизистой оболочки кишки, и позволяют сделать предположение о том, что сниженная проницаемость межклеточного

пути является предпосылкой для транспорта антигенных структур через М-клетки. Практический интерес представляют собой данные об уровне отдельных представителей семейства белка клаудина в фолликул-ассоциированном эпителии Пейеровых бляшек, так как в настоящее время барьер, формируемый плотными контактами, рассматривается в качестве пути для доставки лекарств и вакцин в организм. Результаты диссертации используются в курсах лекции по физиологии, читаемых на биологическом факультете Санкт-Петербургского государственного университета.

Методология и методы исследования. Для выполнения поставленных задач применяли электрофизиологические и молекулярно-биологические методы, позволяющие провести комплексную оценку барьерных свойств различных участков тощей кишки крысы. Данные о сопротивлении и проницаемости ткани получены с помощью камеры Уссинга, метода одноканальной импедансной спектроскопии, исследовании диффузии FITC-декстрана. Изучение комплекса плотных контактов осуществлялось методом Вестерн-блот с последующей денситометрией и методом иммуногистохимии с оценкой иммунофлуоресценции на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе.

Положения, выносимые на защиту:

1. Фолликул-ассоциированный эпителий Пейеровых бляшек кишки крысы обладает выраженными барьерными свойствами, что свидетельствует об ограничении парацеллюлярного транспорта в этой структуре.

2. В пределах одного сегмента тощей кишки характер распределения клаудинов в рядом расположенных клеточных популяциях эпителия соответствует изменению их барьерных свойств.

Личный вклад автора. Автор внес значительный вклад в разработку научной гипотезы, планирование научного исследования, стандартизацию методов выполнения исследования и обсуждение и анализ полученных результатов. Данные, представленные в работе, получены лично автором или при его непосредственном участии в проведении экспериментов. Имена соавторов указаны в соответствующих публикациях.

Апробация результатов исследования. Результаты исследования были представлены для обсуждения на XIV Всероссийской конференции с международным участием «Фундаментальная наука и клиническая медицина – Человек и его здоровье» (2011 год, Санкт-Петербург, Россия); VIII Всероссийская конференция с международным участием, посвященная 220-летию со дня рождения академика К.М. Бэра "Механизмы функционирования висцеральных систем" (2012 год, Санкт-Петербург, Россия); 94-ой Ежегодной Конференции Немецкого Физиологического Сообщества (2015 год, Магдебург, Германия); 24-ой, 25-ой и 26-ой Европейской конференции по изучению

транспорта в эпителии кишки (2011 года, Оксфорд, Англия; 2013 год, Бад-Херренальб, Германия; 2014 год, Марстранд, Швеция).

По теме диссертации опубликованы 2 статьи в рецензируемых журналах, входящих в список ВАК, и 6 тезисов докладов.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 135 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов, обсуждения, выводов и списка литературы, включающего 269 источников. Диссертация иллюстрирована 1-ой таблицей и 21-им рисунком.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

В экспериментах использовали самцов крыс линии Вистар (180-250 г.) (n=60). Все процедуры выполняли в соответствии со стандартами, принятыми организациями по работе с лабораторными животными FELASA и RusLASA. При проведении экспериментов использовались реактивы фирмы Sigma Aldrich (Германия), если не указано другого. Основные опыты были проведены на препаратах ткани тощей кишки. В качестве контроля использовали участки ткани, в которых слизистая оболочка образует ворсинки и крипты, покрытые однослойным цилиндрическим каёмчатым эпителием. Эти участки обозначали как «ворсинчатый эпителий». Свойства данных препаратов сравнивали с участками кишки, содержащими Пейеровы бляшки, покрытые фолликул-ассоциированным эпителием.

Регистрация электрофизиологических характеристик в камере Уссинга. Камера представляет собой полый цилиндр из двух половин, между которыми вертикально монтировался препарат ткани для исследования, создавая, таким образом, два раздельных компартмента: «серозный» и «мукозный». Площадь изучаемой ткани соответствовала диаметру отверстия камер и равнялась 0,13 $см^2$. Каждая половина сообщалась с отдельным стеклянным резервуаром, в котором циркулировало 5 мл раствора Кребса-Рингера (ммоль/л): 119 NaCl, 5 KCl, 1,2 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 25 $NaHCO_3$, 0,4 $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$, 1,6 $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$, 1,2 $CaCl_2$. Раствор, омывающий серозную сторону ткани, дополнительно содержал 10 ммоль/л D-глюкозы. Для сохранения осмотического давления раствор, омывающий «мукозную» сторону, содержал 10 ммоль/л маннита. Стеклянный резервуар имел водяную рубашку для контроля температуры омывающего раствора (37°C) и порт для аэрации карбогеном (95% O_2 и 5% CO_2). Для изучения электрофизиологических характеристик использовали четыре хлорсеребряных электрода,

предусилитель EVC3 и многоканальный автоматический фиксатор тока и напряжения EVC-4000 (World Precision Instruments, США). Регистрация тока короткого замыкания происходила в условиях фиксации напряжения на 0 мВ (мкА/см^2). Для изучения трансэпителиального сопротивления регистрировали изменение напряжения в ответ на импульс тока величиной 10 мкА. Трансэпителиальное сопротивление рассчитывали согласно закону Ома по формуле $R = \Delta U / I$ и корректировали на площадь исследуемого препарата (Ом · см^2).

Изучение эпителиального сопротивления методом одноканальной импедансной спектроскопии. Для изучения вклада эпителиального сопротивления в общее сопротивление ткани использовался метод одноканальной импедансной спектрометрии. Основной особенностью установок для данного метода являлось использование в регистрирующей системе фазочувствительного усилителя (модель 1250, Solartron Schlumberger, Farnborough, Великобритания), который фиксировал изменение напряжения в ответ на импульсы переменного тока величиной 35 мкА/см^2 с варьирующей частотой от 1 Гц до 65 кГц. В условиях переменного тока ёмкостное сопротивление клеточной мембраны изменяется в зависимости от частоты тока. При применении высоких частот проводимость увеличивается, таким образом позволяя регистрировать сопротивление субэпителиальных слоёв. При использовании низких частот проводимость уменьшается, приравнивая условия проведения эксперимента к регистрации в режиме постоянного тока. Значение сопротивления эпителиального слоя высчитывали как разность между трансэпителиальным сопротивлением и сопротивлением субэпителиальных слоёв.

Изучение проницаемости эпителия с помощью флуоресцентно-меченого декстрана различной молекулярной массы. Для проведения исследования препарат Пейеровых бляшек и ворсинчатого эпителия устанавливали в камеры Уссинга, как описано ранее. После начала эксперимента, 500 мкл раствора с мукозной стороны заменяли на 500 мкл аналогичного раствора, содержавшего FITC-декстран массой 4 кДа или 20 кДа для получения финальной концентрации 5 ммоль/л и 0,1 ммоль/л, соответственно, в 5 мл омывающего раствора. Через 60 минут раствор с серозной стороны ткани забирали для определения концентрации диффундировавшего через ткань FITC-декстрана. Для построения стандартной кривой использовали растворы с концентрацией 10, 20, 30 и 40 нмоль/л. Определение интенсивности сигнала FITC-декстрана в растворах осуществлялось с помощью спектрофотометра Cary Eclipse (Agilent, США) при длине волны возбуждения 490 нм и длине волны поглощения 520 нм. Значение проницаемости (P_{app}) рассчитывали по формуле $P_{app} = (dQ / dt) / (A \cdot C_0)$, где dQ / dt – концентрация

декстрана в растворе с серозной стороны через 60 минут инкубации (моль/с); A – площадь исследуемого участка ткани ($см^2$); C_0 – концентрация декстрана в растворе с мукозной стороны в начальный момент времени (моль/л). Учитывая соотношение 1 л = 1000 $см^3$, размерность проницаемости выражается в см/с.

Изучение белков плотных контактов методом Вестерн-блот анализа. Образцы ткани гомогенизировали в лизирующем буфере с добавлением ингибиторов протеаз (Complete, Roche, Германия). Фракция мембранных белков была получена с помощью последовательного центрифугирования при 200g (5 мин, 4°C) и 43000g (30 мин, 4°C). Полученные пробы инкубировали в термостате (30 мин, 37°C) с добавлением Pierce Protein Assay Kit (Thermo Scientific, США). Концентрация белка в пробе определялась с использованием спектрофотометра Tecan Spectra (Tecan, Швейцария) при длине волны 562 нм. Для разделения белков по молекулярной массе проводили электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ) с содержанием SDS 12,5% (100 В; 120 мин, 22°C). Перенос белков с ПААГ на гидрофобные мембраны происходил при постоянном напряжении 100 В (60 мин, 22°C). Для иммунодетекции белков мембраны последовательно инкубировали в блокирующем растворе (TBS, 5% сухое молоко) (120 мин, 22 °C); в растворе первичных антител к клаудину-1, -2, -3, -4, -5, -7, -8 и окклюдину (Invitrogen, США) (1:1000; 4°C); в растворе вторичных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена (Invitrogen, США) (1:1000; 45 мин, 22°C). Визуализация белков осуществлялась после инкубации мембран в растворе Lumi-LightPLUS (Roche Diagnostics, Германия) (5 мин, 22°C) на анализаторе изображений LAS-1000 (Fujifilm, Япония). Обработка изображений выполнялась с помощью программного обеспечения AIDA Raytest 2.5 (Straubenhardt, Германия). Полученные в результате денситометрии значения выражены в оптических единицах. Для последующей статистической обработки данные были переведены в условные единицы, где плотность сигнала для ворсинчатого эпителия принималась за 100%, относительно которого высчитывалось значение в Пейеровых бляшках.

Изучение гистологической структуры ткани методом световой микроскопии. Процедура заливки ткани в парафиновые блоки и подготовка срезов для окраски проводилась согласно описанной ранее методике (Burgel et al. 2002). Полученные срезы монтировались на предметные стёкла и, после процесса депарафинизации, последовательно окрашивались гематоксилином (1 мин, 22ºC) и эозином (30 сек, 22ºC) для визуализации структуры ткани.

Иммуногистохимическое окрашивание парафиновых срезов для изучения локализации белков плотных контактов. Процедура подготовки срезов для проведения

иммуногистохимического окрашивания соответствовала процедуре для световой микроскопии. Парафиновые срезы фиксировали на предметных стёклах и, после депарафинизации, инкубировали в блокирующем растворе (PBS, 5% козья сыворотка, 1% БСА) (120 мин, 22°C). Для детекции белков стёкла со срезами инкубировали в растворе первичных мышиных антител к окклюдину и клаудину-4 или растворе первичных кроличьих антител к клаудину-1, -2, -3, -5, -7 и -8 (Invitrogen, США) (1:100; 60 мин, 37°C); растворе вторичных козьих антимышиных антител Alexa Fluor 488 или вторичных козьих антикроличьих антител Alexa Fluor 594 (Invitrogen, США) (1:500; 45 мин, 37°C). Перед нанесением покровных стёкол срезы инкубировали с красителем DAPI для визуализации клеточных ядер (1:5000; 5 мин, 22°C). Анализ полученных изображений производился с помощью лазерного сканирующего микроскопа LSM 510 META (Zeiss, Германия) и программного обеспечения LSM Image Browser (Zeiss, Германия). Иммунофлуоресценцию для клаудина-4 и окклюдина регистрировали в зеленой области спектра (Alexa Fluor 488), для остальных представителей семейства клаудина – в красной области спектра (Alexa Fluor 594).

Расчет корректирующего коэффициента на основе морфометрического анализа гистологического строения ткани Пейеровых бляшек и ворсинчатого эпителия. При анализе результатов регистрации электрофизиологических параметров, проницаемости и Вестерн-блот анализа важно принимать во внимание, что поверхность Пейеровых бляшек отличается от расположенных рядом участков ворсинчатого эпителия. Поверхность Пейеровых бляшек представляет собой совокупность фолликул-ассоциированных эпителиев и расположенных между ними межфолликулярных ворсинок и крипт. Для учета отличий в площади поверхности, количестве клеток и межклеточных контактов в исследуемых пробах был проведен морфометрический анализ для выведения корректирующего коэффициента, согласно использованному ранее подходу (Smith et al., 1980; Troeger et al., 2007)

С использованием снимков временных препаратов тощей кишки была измерена средняя площадь Пейеровых бляшек, среднее количество лимфоидных фолликулов и средняя площадь фолликул-ассоциированного эпителия. С учетом данных из ранних исследований (Smith et al. 1980; Troeger et al. 2007), было подсчитано, что площадь поверхности мукозы Пейеровых бляшек составила 17,2 $см^2$, в то время как площадь поверхности мукозы участка ворсинчатого эпителия идентичного диаметра составила 45,3 $см^2$. Таким образом, корректирующий коэффициент для данных эпителиального сопротивления, тока короткого замыкания и проницаемости для FITC-декстрана составил 2,62.

На гистологических срезах, окрашенных флуоресцентным красителем DAPI, был произведен подсчет клеток на единицу длины в фолликул-ассоциированном эпителии и ворсинчатом эпителии. На основании полученных данных был выведен корректирующий коэффициент для результатов об уровне белков плотных контактов, полученных с помощью метода Вестерн-блот, который составил 1,6.

Статистическая обработка полученных данных. Статистическую обработку выполняли с помощью программы прикладного статистического анализа IBM SPSS Statistics version 21. Обработка результатов измерений электрофизиологических параметров Пейеровых бляшек из различных сегментов тонкой кишки, проницаемости эпителия для молекул FITC-декстрана и уровня белков плотных контактов, в которых использовались связанные выборки, происходила с использованием Т-критерия Вилкоксона. Полученные результаты представлены в виде медиан. Обработка результатов сравнительного анализа электрофизиологических параметров фолликул-ассоциированного эпителия и ворсинчатого эпителия тощей кишки и результатов импедансной спектроскопии, в которых использовались несвязанные выборки и которые соответствовали нормальному распределению, происходила с использованием t-критерия Стьюдента. Данные представлены в виде средних значений ± ошибка средней. Уровень значимости $p<0,05$ принимался как статистически значимый.

Результаты и обсуждение

Электрофизиологические характеристики Пейеровых бляшек разных сегментов тонкой кишки. При изучении трансэпителиальной разности потенциалов было установлено, что величина этого параметра для Пейеровых бляшек из двенадцатиперстной, тощей и подвздошной кишки равнялась -1,6 мВ, -1,8 мВ и -1,1 мВ, соответственно. При этом статистически достоверных отличий выявлено не было ($p>0,05$; $n=5$, Т-критерий Вилкоксона). Регистрация тока короткого замыкания показала, что этот параметр также не отличался между исследованными образцами и составил 13 мкА/см^2, 14 мкА/см^2 и 9 мкА/см^2 в Пейеровых бляшках двенадцатиперстной, тощей и подвздошной кишки, соответственно ($p>0,05$; $n=5$). При изучении трансэпителиального сопротивления его максимальное значение было зарегистрировано в Пейеровых бляшках двенадцатиперстной кишки — 111 Ом·см^2, что, однако, не отличалось от трансэпителиального сопротивления Пейеровых бляшек тощей и подвздошной кишок - 94 Ом·см^2 и 100 Ом·см^2, соответственно ($p>0,05$; $n=5$). Таким образом, Пейеровы бляшки разных сегментов кишки крысы имели сходные электрофизиологические параметры и, следовательно, сходные барьерные свойства фолликул-ассоциированного эпителия.

Сравнительный анализ электрофизиологических характеристик Пейеровых бляшек и ворсинчатого эпителия тощей кишки крысы. При сравнении электрофизиологических характеристик было установлено, что трансэпителиальная разность потенциалов эпителия Пейеровых бляшек и ворсинчатого эпителия тощей кишки крысы не отличалась и составляла -2,0 ± 0,2 мВ и -1,8 ± 0,2 мВ, соответственно (p>0,05; n=22, t-тест Стьюдента). При регистрации тока короткого замыкания выявлено, что между исследуемыми участками тощей кишки имеется достоверное отличие – величина в ворсинчатом эпителии почти в два раза превышала величину этого параметра в Пейеровых бляшках: 25 ± 1,7 мкА/см^2 и 14 ± 1,1 мкА/см^2, соответственно (p<0,001; n=22) (рис. 1 А). Так как величина тока короткого замыкания зависит от площади исследуемого участка, после применения корректирующего коэффициента разница между препаратами ткани изменилась: значение в Пейеровых бляшках стало равно 5 ± 0,4 мкА/см^2 (p<0,001; n=22) (рис. 1 А). Значение трансэпителиального сопротивления исследуемых образцов тощей кишки также достоверно отличалось: в ворсинчатом эпителии оно равнялось 63 ± 4 Ом·см^2, в то время как в Пейеровых бляшках было выше в полтора раза - 94 ± 5 Ом·см^2 (p<0,001; n=22) (рис. 1 Б).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что электрофизиологические характеристики двух расположенных рядом участков тощей кишки крысы, фолликул-ассоциированного эпителия и ворсинчатого эпителия, выполняющих различные функции, отличаются.

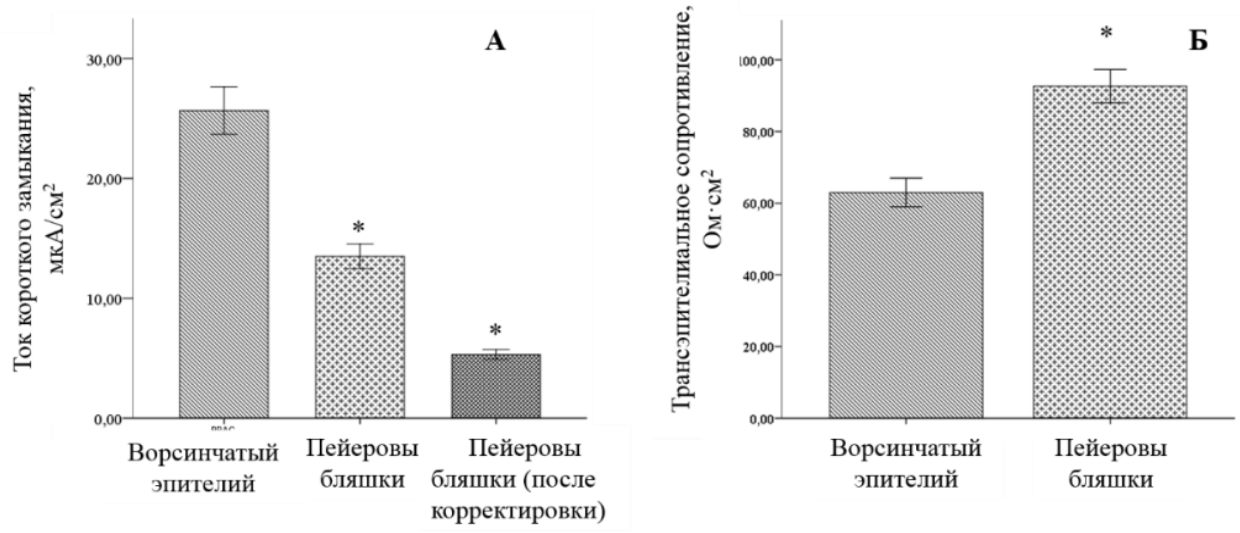

Рисунок 1. Электрофизиологические характеристики Пейеровых бляшек и ворсинчатого эпителия тощей кишки крысы.

А - Ток короткого замыкания; Б – Трансэпителиальное сопротивление.

** - по сравнению с ворсинчатым эпителием; p<0,001; n=22; t-тест Стьюдента.*

Изучение вклада эпителиального и субэпителиального сопротивления в трансэпителиальное сопротивление Пейеровых бляшек и ворсинчатого эпителия тощей кишки крысы. При анализе данных о трансэпителиальном сопротивлении необходимо учитывать, что препараты ткани Пейеровых бляшек и ворсинчатого эпителия, которые монтировались в камеру Уссинга, различаются по своему гистологическому строению, в том числе по строению субэпителиальных слоёв, где в Пейеровых бляшках располагаются лимфоидные фолликулы. Для изучения вклада эпителиального и субэпителиального сопротивления в трансэпителиальное сопротивление был использован метод одноканальной импедансной спектрометрии. В результате проведенных экспериментов было показано, что субэпителиальное сопротивление Пейеровых бляшек превышало сопротивление субэпителиальных слоёв ворсинчатого эпителия более чем в полтора раза и составило 66 ± 5,7 Ом·см^2 по сравнению с 38 ± 1,6 Ом·см^2 (p<0,001; n=19 и n=25, t-тест Стьюдента) (рис. 2).

Величина эпителиального сопротивления Пейеровых бляшек равнялась 30 ± 5,4 Ом·см^2 и более чем в два раза превосходила величину сопротивления эпителия ворсинчатого участка кишки, которое составляло 13 ± 1,3 Ом·см^2 (p<0,001; n=19 и n=25) (рис. 2). При анализе полученных данных необходимо учитывать различную структуру и форму фолликул-ассоциированного эпителия и эпителия ворсинчатого участка кишки.

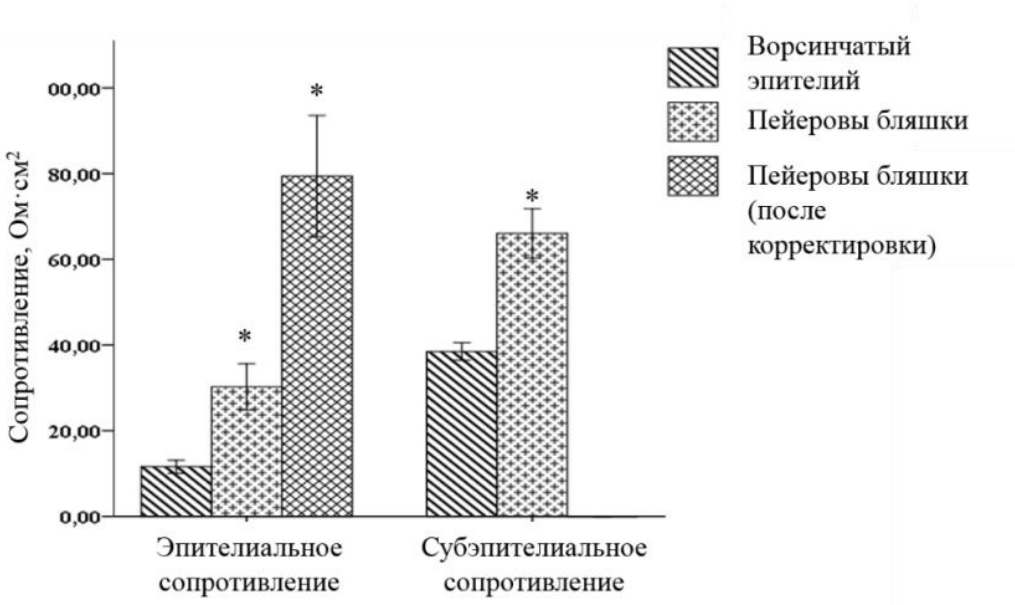

Рисунок 2. Сопротивление эпителиального и субэпителиального слоя ткани Пейеровых бляшек и ворсинчатого эпителия тощей кишки крысы.

** - по сравнению с ворсинчатым эпителием, p<0,001; n=19 и n=25 для Пейеровых бляшек и ворсинчатого эпителия, соответственно; t-тест Стьюдента.*

После применения выведенного ранее корректирующего коэффициента значение эпителиального сопротивления Пейеровых бляшек составляло 79 ± 14,2 Ом·см^2 и было больше сопротивления эпителиального слоя ворсинчатого участка кишки в шесть раз (p<0,001; n=19 и n=25) (рис. 2).

Значения сопротивления субэпителиальных слоёв корректировке не подвергались, так как площадь серозной стороны у исследуемых препаратов не отличается по своей структуре и лимитирована размером отверстия камер для ткани. Таким образом, сопротивление эпителиального слоя – структуры, непосредственно формирующей барьер между содержимым просвета кишки и внутренней средой организма, выше для фолликул-ассоциированного эпителия по сравнению с ворсинчатым эпителием кишки.

Изучение проницаемости фолликул-ассоциированного эпителия Пейеровых бляшек тощей кишки для декстрана различной молекулярной массы. Для изучения роли парацеллюлярного пути в формирование барьерной структуры эпителия Пейеровых бляшек был использован метод оценки проницаемости с помощью флуоресцентно-меченых молекул декстрана (FITC-декстран) различной молекулярной массы. В результате проведенных экспериментов было показано, что ворсинчатый эпителий тощей кишки крысы проницаем для декстрана с молекулярной массой 4 кДа и 20 кДа. Было установлено, что при увеличении молекулярной массы декстрана от 4 кДа до 20 кДа происходит снижение величины проницаемости с 0,33 $\cdot 10^{-3}$ см/с до 0,013 $\cdot 10^{-3}$ см/с (p<0,05; n=5, Т-критерий Вилкоксона) (рис. 3).

Фолликул-ассоциированный эпителий Пейеровых бляшек также был проницаем для FITC-декстрана молекулярной массой 4 кДа и 20 кДа, и, аналогично ворсинчатому эпителию, наблюдалось достоверное уменьшение проницаемости для декстрана при увеличении его молекулярной массы. Для декстрана с молекулярной массой 4 кДа значение проницаемости составило 0,125 $\cdot 10^{-3}$ см/с, для декстрана молекулярной массы 20 кДа величина проницаемости составила 0,003 $\cdot 10^{-3}$ см/с (p<0,05; n=5) (рис. 3).

Сравнение результатов диффузии декстрана выявило достоверные отличия в зависимости от молекулярной массы декстрана и вида эпителия. Проницаемость эпителия Пейеровых бляшек для декстрана молекулярной массой 4 кДа была в три раза меньше проницаемости ворсинчатого эпителия для этих молекул (p<0,05; n=5) (рис. 3). Проницаемость для декстрана с массой молекул 20 кДа в эпителии Пейеровых бляшек была в четыре раза меньше по сравнению с проницаемостью ворсинчатого эпителия для этого вещества, однако статистически достоверных отличий выявлено не было (p>0,05; n=5).

При изучении проницаемости для молекул, аналогично изучению электрофизиологических параметров, важно учитывать различия в площади поверхности эпителиального слоя сравниваемых препаратов. После применения корректирующего коэффициента разница проницаемости сравниваемых препаратов изменилась: проницаемость фолликул-ассоциированного эпителия для молекул массой 4 кДа по сравнению с ворсинчатым эпителием стала меньше в семь раз ($p<0,05$; $n=5$), а проницаемость для молекул массой 20 кДа - в десять раз и являлась статистически достоверной ($p<0,05$; $n=5$). Таким образом, парацеллюлярный барьер фолликул-ассоциированного эпителия Пейеровых бляшек характеризуется снижением проницаемости по сравнению с ворсинчатым эпителием тощей кишки крысы.

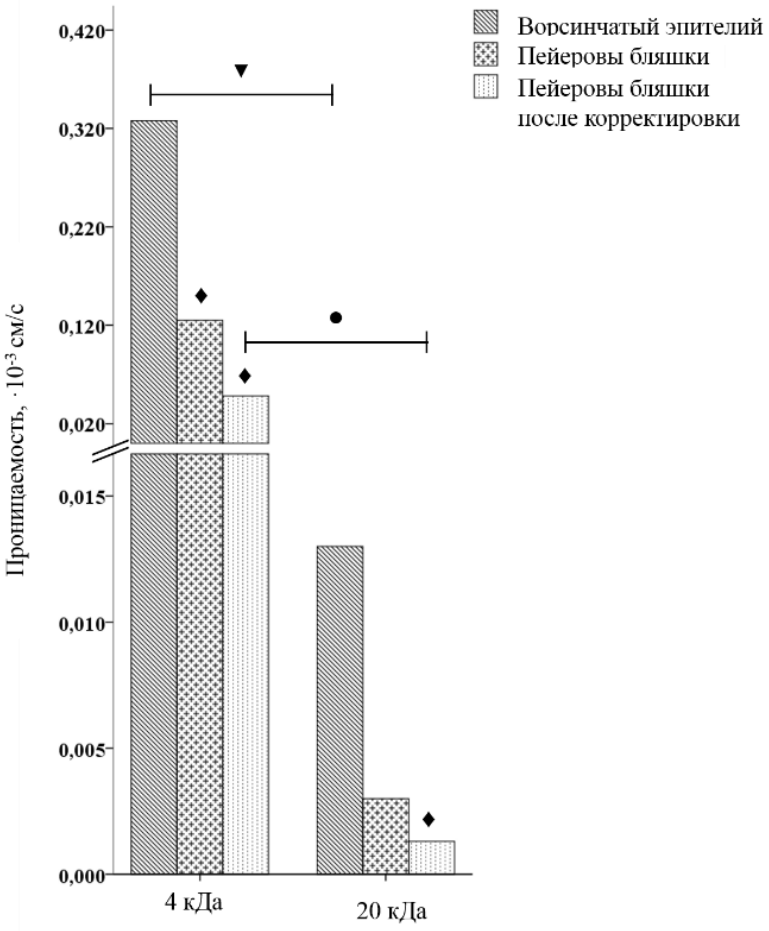

Рисунок 3. Проницаемость ткани Пейеровых бляшек и ворсинчатого эпителия тощей кишки для флуоресцентно-меченых молекул декстрана массой 4 и 20 кДа .

▼ *- по сравнению со значением проницаемости для 4 кДа в ворсинчатом эпителии. $p<0,05$; $n=5$; Т-критерий Вилкоксона.*

● *- по сравнению со значением проницаемости для 4 кДа в эпителии Пейеровых бляшек. $p<0,05$; $n=5$; Т-критерий Вилкоксона.*

♦ *- по сравнению с ворсинчатым эпителием. $p<0,05$; $n=5$; Т-критерий Вилкоксона.*

Определение уровня белков плотных контактов в эпителии Пейеровых бляшек и ворсинчатом эпителии тощей кишки. Учитывая результаты о разнице в эпителиальном сопротивлении и диффузии макромолекул, важным этапом исследования было изучение уровня белков семейства клаудина, которые являются молекулярными детерминантами парацеллюлярной проницаемости. Во всех экспериментах в эпителии Пейеровых бляшек и в ворсинчатом эпителии были обнаружены клаудин-1, -2, -3, -4, -5, -7, -8 и окклюдин. Клаудины идентифицировались как белки с молекулярной массой 18–24 кДа, окклюдин - 60-65 кДа. (рис. 4).

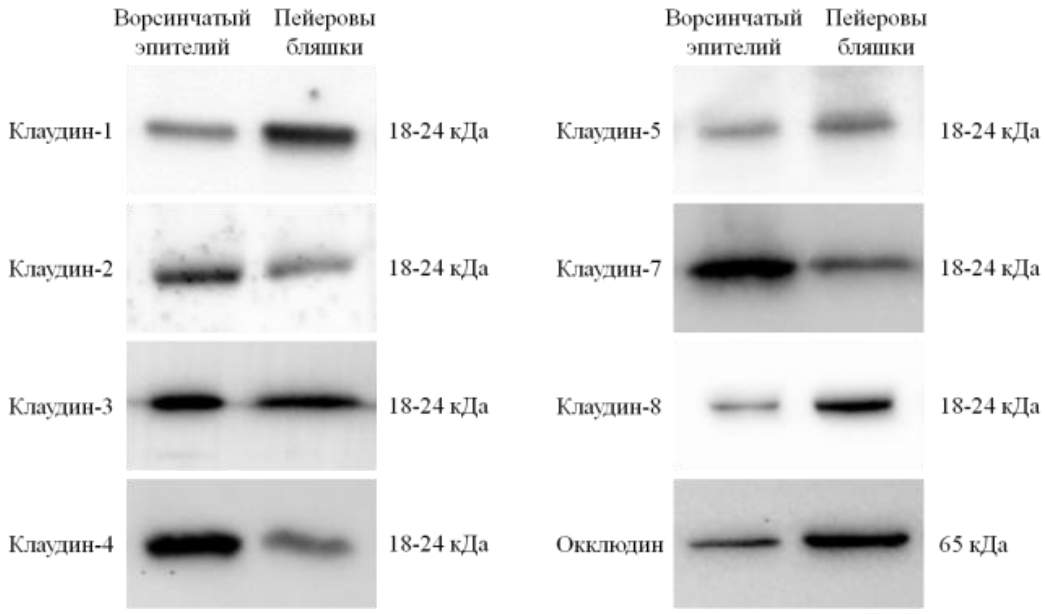

Рисунок 4. Оригинальные изображения Вестерн-блот белков плотных контактов клаудина-1, -2, -3, -4, -5, -7, -8 и окклюдина в ворсинчатом эпителии и Пейеровых бляшках тощей кишки крысы.

При анализе результатов Вестерн-блот для отдельных клаудинов была выявлена разница в интенсивности сигналов в исследованных образцах. С помощью метода денситометрии было установлено, что уровень клаудина-5 (n=6) и клаудина-8 (n=6) был выше в эпителии Пейеровых бляшек по сравнению с ворсинчатым эпителием (p<0,05, Т-критерий Вилкоксона) (рис. 5). Одновременно с этим количество клаудина-2 (n=6) и клаудина-7 (n=5) было достоверно меньше в эпителии Пейеровых бляшек по сравнению с ворсинчатым эпителием (p<0,05) (рис. 5). После применение коэффициента корректировки, полученного в результате морфометрического анализа, спектр клаудинов, уровень которых отличается в фолликул-ассоциированном эпителии, изменился. Было установлено, что уровень снижающих проницаемость эпителиального слоя клаудина-5 и клаудина-8 в эпителии Пейеровых бляшек по-прежнему был статистически выше по сравнению с ворсинчатым эпителием кишки (p<0,05), в то время как достоверных отличий

для повышающих проницаемость клаудина-2 и клаудина-7 выявлено не было (p>0,05) (рис. 5). Применение корректирующего коэффициента позволило выявить, что уровень уплотняющего белка клаудина-1 (n=7) выше в фолликул-ассоциированном эпителии по сравнению с ворсинчатым эпителием кишки (p<0,05) (рис. 5).

Таким образом, эпителий Пейеровых бляшек характеризуется более высоким уровнем клаудина-1, -5 и -8, ограничивающих диффузию для макромолекул и ионов по парацеллюлярному пути.

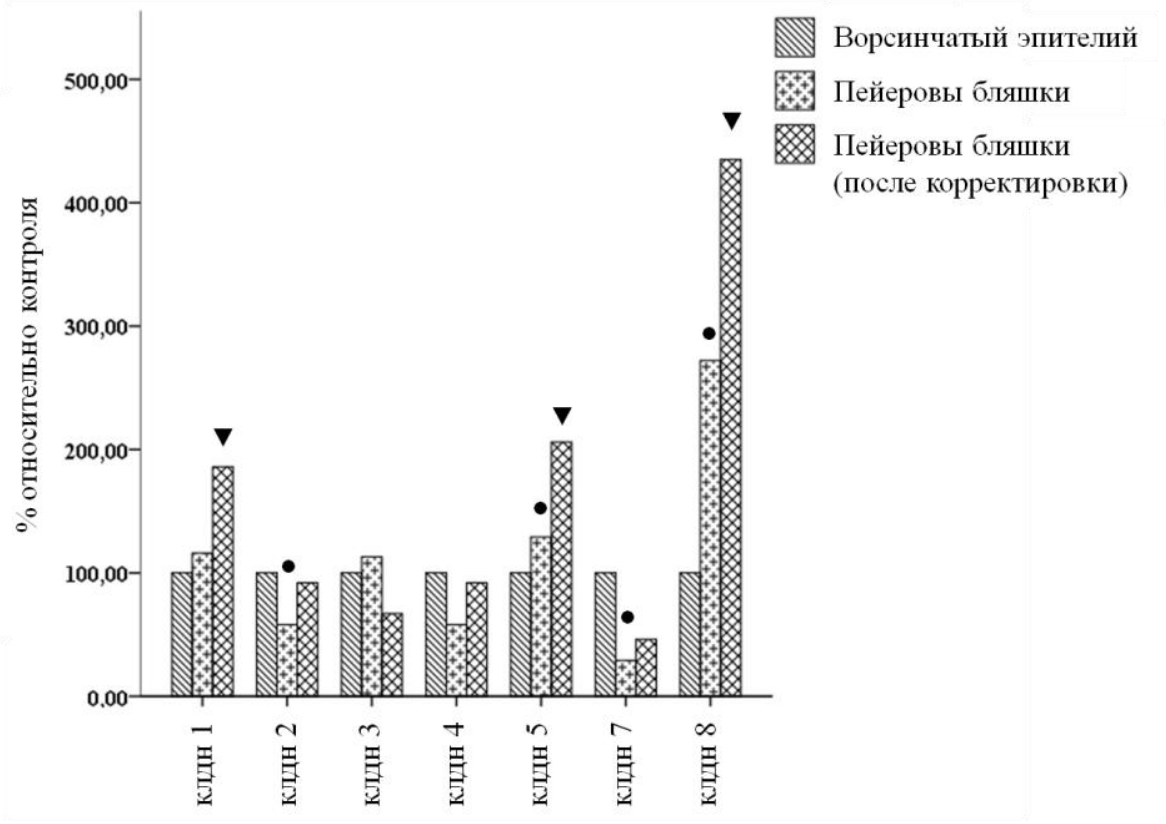

Рисунок 5. Сравнение интенсивности сигнала белков плотных контактов в Пейеровых бляшках и ворсинчатом эпителии тощей кишки крысы с помощью метода денситометрии.

● - по сравнению с ворсинчатым эпителием до применения коэффициента корректировки. p<0,05; n=5-7; Т-критерий Вилкоксона.

▼ - по сравнению с ворсинчатым эпителием после применения коэффициента корректировки. p<0,05; n=5-7; Т-критерий Вилкоксона.

клдн - клаудин.

Изучение локализации белков плотных контактов в эпителии Пейеровых бляшек и ворсинчатом эпителии тощей кишки. В ходе проведения иммунофлуоресцентного анализа на срезах тканей были обнаружены сигналы от клаудина-1, -2, -3, -4, -5, -7, -8 и окклюдина. Для всех белков показана локализация в латеральной части апикальной мембраны фолликул-ассоциированного эпителия Пейеровых бляшек и ворсинчатого эпителия тощей кишки, то есть области, в которой располагается комплекс белков плотных контактов. Белки, расположенные в этой зоне,

принимают непосредственное участие в регуляции барьерной функции эпителия. Стоит подчеркнуть, что в фолликул-ассоциированном эпителии клаудин-1 и -5 были стабильно локализованы в области плотных контактов, в то время как в ворсинчатом эпителии их сигнал в области плотных контактов присутствовал не во всех клетках вдоль мукозной поверхности (рис. 6). В то же время для данных белков выявлен слабый сигнал в апикальной мембране фолликул-ассоциированного эпителия, то есть вне области плотных контактов. Это обозначает, что лишь малая часть от общего уровня белка, детектированного методом Вестерн-блот анализа, не вносит вклад в формирование барьерных свойств. Одновременно с этим для ряда клаудинов выявлена локализация в области базолатеральной части плазматической мембраны эпителиоцитов. Интенсивное окрашивание в этом регионе показано для клаудина-3 и -7 – белков, для которых Вестерн-блот анализ не выявил достоверной разницы в их уровне между Пейеровыми бляшками и ворсинчатым эпителием (рис. 6).

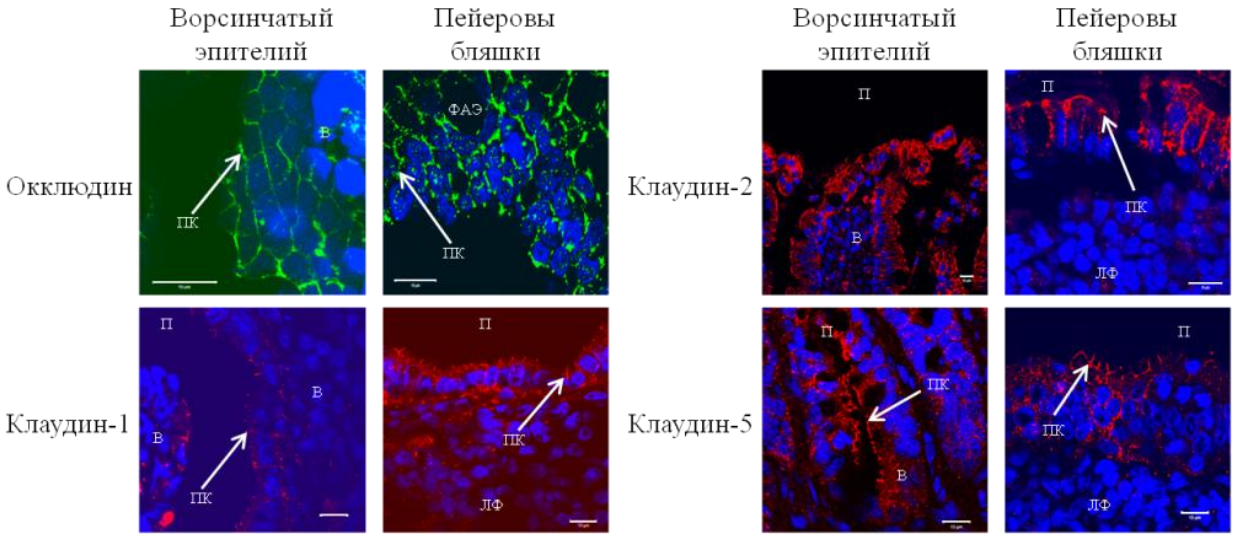

Рисунок 6. Иммуногистохимическое окрашивание окклюдина, клаудина-1, -2 и -5 в фолликул-ассоциированном эпителии Пейеровых бляшек и ворсинчатом эпителии тощей кишки крысы.

Красное свечение — клаудин-1; зеленое свечение – окклюдин; синее свечение — окраска ядер флуоресцентным красителем DAPI.

ПК – плотные контакты; В – ворсинка; П – просвет кишки; ЛФ – область лимфоидных фолликулов.

Масштабная линейка на всех изображениях – 10 мкм.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты свидетельствуют о различии электрофизиологических характеристик фолликул-ассоциированного эпителия Пейеровых бляшек и расположенного рядом ворсинчатого эпителия тощей кишки крысы. Для эпителия Пейеровых бляшек характерно более высокое значение трансэпителиального сопротивления, которое отражает общую проницаемость ткани. Применение метода

одноканальной импедансной спектроскопии позволило выявить, что в основе разницы в трансэпителиальном сопротивлении двух сравниваемых участков тощей кишки лежит бóльшее сопротивление эпителиального слоя, непосредственно формирующего барьерную структуру. Данный параметр является интегральным и включает в себя проницаемость трансцеллюлярного и парацеллюлярного пути для ионов и молекул. В подтверждение этой закономерности было установлено, что величина тока короткого замыкания, которая является отражением процессов первично- и вторично-активного транспорта ионов и веществ, достоверно ниже в эпителии Пейеровых бляшек. Эти данные на функциональном уровне подтверждают продемонстрированные ранее отличия в экспрессии транспортеров и переносчиков. Так, в эпителии Пейеровых бляшек снижена экспрессия натрий-калиевой АТФазы (Mason et al., 1994), которая является ведущим звеном в обеспечении векторного транспорта через эпителий. Кроме этого, в эпителии Пейеровых бляшек по сравнению с ворсинчатым эпителием кишки не экспрессируется белок-переносчик SGLT1 и транспортер глюкозы GLUT2 (Yoshikawa et al., 2011).

На основании полученных данных можно утверждать, что увеличение барьерных свойств в фолликул-ассоциированном эпителии Пейеровых бляшек обусловлено снижением проницаемости парацеллюлярного пути для макромолекул. Об этом свидетельствуют результаты изучения диффузии флуоресцентно-меченого декстрана молекулярной массой 4 кДа и 20 кДа, демонстрирующие ограничение парацеллюлярного транспорта макромолекул в фолликул-ассоциированном эпителии Пейеровых бляшек по сравнению с ворсинчатым эпителием.

Изучение белков семейства клаудина, являющихся молекулярными детерминантами парацеллюлярного транспорта, также подтверждает выдвинутое предположение. В фолликул-ассоциированном эпителии Пейеровых бляшек и ворсинчатом эпителии тощей кишки выявлен одинаковый спектр клаудинов, однако для фолликул-ассоциированного эпителия характерен более высокий уровень клаудина-1, -5 и -8. В модельных опытах на животных и различных клеточных линиях установлено, что увеличение экспрессии генов клаудина-1, -5 и -8 ведет к повышению трансэпителиального сопротивления и ограничению движения ионов и макромолекул по парацеллюлярному пути, в то время как нокаут по генам этих белков приводит к потере барьерных свойств ткани (Günzel and Fromm, 2012). Определение иммуногистохимическим способом локализации клаудина-1 и клаудина-5 в области плотных контактов подтверждает вклад данных клаудинов в барьерные свойства фолликул-ассоциированного эпителия Пейеровых бляшек.

Таким образом, комплексное исследование, проведенное с применением электрофизиологических и молекулярно-биологических методов, позволяет говорить, что парацеллюлярная проницаемость эпителия Пейеровых бляшек для ионов и макромолекул снижена по сравнению с ворсинчатым эпителием в результате бóльшего уровня отдельных представителей белков семейства клаудина. Анализируя полученные данные с функциональной точки зрения можно предположить, что ограничение парацеллюлярного транспорта в фолликул-ассоциированном эпителии Пейеровых бляшек является одним из необходимых условий для представления антигенов пищи и патогенов иммунокомпетентным клеткам через специализированные М-клетки Пейеровых бляшек.

Клетки, выстилающие поверхность фолликул-ассоциированного эпителия Пейеровых бляшек и эпителия ворсинок, пролиферируют и мигрируют из общих крипт, расположенных между ними (Smith et al., 1980). Ранее было установлено, что особенности распределения белков плотных контактов в сегментах кишки крысы совпадают с барьерными свойствами и функциональными характеристиками этих сегментов (Markov et al., 2010). В данном исследовании сравнительный анализ выявил гетерогенность барьерных свойств и уровня клаудинов в пределах одного сегмента между соседними участками. Таким образом, клетки одной популяции способны формировать барьерные структуры, отличающиеся по своим характеристикам проницаемости, что является важным с точки зрения изучения фенотипической изменчивости ткани под влиянием условий окружающей среды, а также для понимания роли отдельных компонентов тканевых барьеров.

ВЫВОДЫ

1. В тощей кишке крысы величина трансэпителиального сопротивления Пейеровых бляшек (94 ± 5 Ом·см^2) достоверно больше трансэпителиального сопротивления участка кишки, выстланного эпителием ворсинок (63 ± 4 Ом·см^2). Сопротивление фолликул-ассоциированного эпителия Пейеровых бляшек (79 ± 14 Ом·см^2) статистически достоверно превышает сопротивление эпителия ворсинок (13 ± 1 Ом·см^2).

2. Парацеллюлярная проницаемость фолликул-ассоциированного эпителия Пейеровых бляшек тощей кишки для молекул декстрана различной молекулярной массы достоверно меньше по сравнению с проницаемостью соседнего эпителия ворсинок. Значение проницаемости для декстрана молекулярной массой 4 кДа было снижено в семь раз, а для декстрана с молекулярной массой 20 кДа - в десять раз.

3. В фолликул-ассоциированном эпителии Пейеровых бляшек были обнаружены клаудин-1, -2, -3, -4, -5, -7, -8 и окклюдин. Клаудины идентифицировали как белки с молекулярной массой 18–24 кДа, окклюдин как белок с молекулярной массой 60-65 кДа. Уровень белков клаудина-1, -5, -8, которые снижают проницаемость эпителия, был достоверно выше в фолликул-ассоциированном эпителии Пейеровых бляшек по сравнению с эпителием ворсинок. Уровень клаудина-2, который повышает проницаемость эпителия, оставался без изменений в обоих исследованных участках тощей кишки.

4. С помощью иммуногистохимии была установлена локализация клаудина-1, -2, -3, -4, -5, -7, -8 и окклюдина в мембране клеток фолликул-ассоциированного эпителия Пейеровых бляшек и эпителия ворсинок тощей кишки. Для всех клаудинов показана локализация в латеральной части апикальной мембраны эпителиальных клеток, то есть области, в которой располагается комплекс белков плотных контактов.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ АВТОРОМ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах, входящих в список ВАК:

1. Markov, A.G. Claudin expression in follicle-associated epithelium of rat Peyer's patches defines a major restriction of the paracellular pathway / A.G. Markov, E.L. Falchuk, N.M. Kruglova, J. Radloff, S. Amasheh // Acta Physiologica. – 2016. – Т. 216. – № 1. – С. 112-119.

2. Фальчук, Е.Л. Изучение барьерных характеристик эпителия Пейеровых бляшек крысы / Е.Л. Фальчук, А.Г. Марков // Вестник Санкт-Петербургского университета. Серия 3. Биология. – 2015. – Вып. 3. – С. 75-86.

Тезисы конференций:

3. Markov, A.G. Molecular and functional characterization of the epithelial barrier of rat small intestinal Peyer's patches / A.G. Markov, E.L. Falchuk, S. Amasheh // Acta Physiologica. – 2015. – Т. 213. –С. 104-104.

4. Falchuk, E.L. Barrier characteristics of rat Peyer's patches epithelium / E.L. Falchuk, S. Amasheh, A.G. Markov // Acta Physiologica. –2015. –S701.

5. Falchuk, E.L. Electrophysiological characteristics of rat Peyer's patches epithelium / E.L. Falchuk, S. Amasheh, A.G. Markov // J. Physiol. Biochem. – 2013. – Т. 69. – № 3. – С. 667.

6. Falchuk, E.L. Expression of tight junction proteins in rat Peyer's patches epithelium / E.L. Falchuk, S. Amasheh, A.G. Markov // Genes Nutr. – 2012. – Т. 6. – С. 73.

7. Марков, А.Г. Экспрессия белков плотных контактов в проницаемом и непроницаемом эпителии / А.Г. Марков, Е.Л. Фальчук, Н.М. Круглова, В.Л. Розломий // VIII Всероссийская конференция с международным участием, посвященная 220-летию со дня рождения академика К.М. Бэра "Механизмы Функционирования Висцеральных Систем". – 2012. – С. 144-145.

8. Фальчук, Е.Л. Влияние протамина на экспрессию белков плотных контактов в эпителии тонкой кишки и фолликул-ассоциированном эпителии Пейеровых бляшек крыс / Е.Л. Фальчук // XIV Всероссийская медико-биологическая конференция молодых исследователей (с международным участием). – 2011. – С. 274-275.