

На правах рукописи

Вишневская
Ольга Николаевна

ПРОНИЦАЕМОСТЬ СТЕНКИ ТОЩЕЙ КИШКИ КРЫСЫ
ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ХОЛЕРНОГО ТОКСИНА И ЛИПОПОЛИСАХАРИДА

03.03.01 – физиология

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург
2018

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, зав. кафедрой общей физиологии биологического факультета, Санкт-Петербургский государственный университет

Рыбальченко Оксана Владимировна

доктор биологических наук, доцент, профессор кафедры физиологии медицинского факультета, Санкт-Петербургский государственный университет

Консультант:

Ашенбах Йорг

доктор медицинских наук, профессор, директор института ветеринарной физиологии Свободного университета Берлина

Официальные оппоненты:

Ермоленко Елена Игоревна

доктор медицинских наук, заведующий лабораторией биомедицинской микроэкологии, отдел молекулярной микробиологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины»

Громова Людмила Викторовна

доктор биологических наук, заведующий лабораторией физиологии питания Федерального бюджетного учреждения науки «Институт физиологии им. И.П. Павлова Российской Академии Наук»

Ведущая организация:

Федеральное бюджетное учреждение науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера», Санкт-Петербург

Защита состоится « » _____ 2018 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 « » _____ 2018 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета:

Ордян Наталья Эдуардовна, доктор биологических наук

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Проницаемость эпителиального кишечного барьера для различных молекул, а также для бактерий, зависит от воздействия ряда факторов: физиологического состояния клеток в слизистой оболочке кишечника, клеточной гипоксии, окислительного стресса, состояния кислотности и уровня провоспалительных цитокинов (Бондаренко, Лиходед, 2012). Показано, что некоторые бактериальные токсины способны вызывать изменения количественного и качественного состава молекулярных компонентов эпителиального барьера, отвечающих за его проницаемость (Berkes et al., 2003). Барьерная функция эпителия является ключевой при развитии воспалительных заболеваний кишечника, при этом нормальное функционирование эпителия требует постоянного поддержания баланса между реактивностью и толерантностью к микроорганизмам просвета кишечника.

Изменение барьерных функций влечет за собой трансформации свойств эпителия, проявляющиеся в нарушении проницаемости для воды, ионов (Zeissig et al., 2007) и, в конечном итоге, может привести к транслокации бактерий из просвета кишки в лимфу и системный кровоток. При хронических заболеваниях и при дисбактериозе кишечника условно патогенные микроорганизмы, колонизируя слизистые оболочки, образуют биопленки, которые могут стать источником распространения бактерий по всему организму. Возможно, именно при нарушении структуры эпителиального пласта начинается транслокация бактерий и их токсинов в лимфатическую и кровеносную системы.

Барьерные свойства эпителия определяются комплексом белков плотных контактов, расположенных в апикальной части клеток и соединяющих соседние клетки. В этой связи белки плотных контактов, обеспечивающие развитие эпителиального транспортного фенотипа и создающие барьер для движения ионов и веществ по межклеточному пути, стали наиболее важным объектом исследования при анализе возможных механизмов регуляции парацеллюлярного транспорта. Показано, что избирательная проницаемость эпителия напрямую зависит от молекулярного состава плотных контактов эпителия (Amasheh et al., 2009; Markov et al., 2016). К основным белкам плотных контактов относятся окклюдин и клаудины (Furuse et al., 1998; Tsukita, Furuse, 2001). По своим функциям эти белки можно подразделить на две группы: порообразующие клаудины -2, -7, -12, -15, -16 формируют селективные ионные поры, а клаудины -1, -3, -4, -5, -8, -14, -18, -19, напротив, способны снижать проницаемость эпителия (Günzel, Fromm, 2012).

Особое внимание привлекает взаимодействие белков плотных контактов с различными веществами, в том числе с бактериальными токсинами, приводящее к изменению количественного и качественного состава данных белков в плотных контактах, а

также их локализации (Verkes et al., 2003). Физиологическая активность секретиромых бактериями соединений определяет стратегию выживания микроорганизмов, которые могут секретировать различные экзотоксины, а при разрушении клеток грамотрицательных бактерий образовывать эндотоксины, включающие фрагменты собственных клеточных стенок.

Один из известных экзотоксинов – холерный токсин, механизм действия которого на клетки эпителия тонкой кишки хорошо известен (Köckerling, Fromm, 1993), но его влияние на межклеточную проницаемость, а именно на уровень белков плотных контактов, остается неизученным.

Показано, что эндотоксин (липополисахарид) естественным путем постоянно образующийся в просвете желудочно-кишечного тракта при физиологической гибели грамотрицательных бактерий на стадии их отмирания и при воздействии различных антимикробных факторов (например, антимикробных препаратов), может оказывать токсическое действие на организм-хозяина, например, экспрессируя гены, индуцирующие синтез провоспалительных цитокинов и других медиаторов воспаления (Бондаренко, Рябиченко, 2007). Однако, детальный анализ действия липополисахарида на апикальную сторону эпителия кишки у животных отсутствует.

Целью данной работы являлось исследование барьерных свойств эпителия тощей кишки крысы и линии клеток IPEC-J2 и ультраструктурных изменений энтероцитов слизистых оболочек тощей кишки крыс при действии холерного токсина и липополисахарида.

Задачи исследования:

1. Изучение трансэпителиального сопротивления и проницаемости эпителия тощей кишки крысы и монослоя клеток линии IPEC-J 2 при действии холерного токсина и липополисахарида.
2. Электронно-микроскопическое исследование ультраструктуры энтероцитов тощей кишки крысы при действии холерного токсина и липополисахарида.
3. Анализ уровня белков плотных контактов эпителия тощей кишки крысы и клеток IPEC-J2 при действии холерного токсина и липополисахарида.

Научная новизна. Впервые для исследования плотных контактов эпителия тощей кишки крысы и линии клеток IPEC-J2 был применен комплексный подход, включающий в себя молекулярно-биологические, электронно-микроскопические и электрофизиологические методы. Получены новые данные, свидетельствующие о том, что действие холерного токсина вызывает снижение барьерных свойств эпителия и увеличение парацеллюлярной проницаемости. К приоритетным и принципиально новым результатам стоит отнести данные

о том, что липополисахарид при действии его на апикальную сторону мембраны вызывает усиление барьерных свойств эпителия. Впервые при электронно-микроскопическом исследовании ультраструктуры энтероцитов тощей кишки крысы показано, что действие липополисахарида не приводит к визуально различимым деструктивным изменениям в энтероцитах, например, к изменению объема, что является характерным отражением трансэпителиального перемещения различных ионов и воды, происходящем в случае воздействия холерного токсина. Впервые установлено, что при действии холерного токсина и липополисахарида происходит изменение уровня клаудинов, повышающих и снижающих проницаемость эпителия.

Теоретическая и практическая значимость работы. В представленной работе описан новый комплексный подход в исследовании действия экзотоксинов и эндотоксинов на барьерные свойства эпителия кишки. Полученные данные вносят новый вклад в понимание механизмов влияния микроорганизмов на эпителий слизистой оболочки кишки, что важно для разработки новых гипотез о процессе транслокации бактерий через тканевые барьеры. Проведенные эксперименты имеют важную практическую значимость в связи с возможностью разработки методов предупреждения бактериальной инвазии в желудочно-кишечном тракте.

Положения, выносимые на защиту:

1. Действие экзотоксинов и эндотоксинов имеет различное влияние на эпителий слизистой оболочки тощей кишки крыс.
2. Влияние бактериальных токсинов (экзотоксина, эндотоксина) является специфичным для определенного сегмента кишки крыс.
3. Изменение барьерных свойств эпителиоцитов тощей кишки крыс зависит от уровня белков плотных контактов, реагирующих на воздействие холерного токсина и липополисахарида.

Личный вклад автора. Автор участвовал в разработке концепции и обсуждении рабочего плана научного исследования, проведении экспериментальной работы, обсуждении результатов и написании выводов. Данные, изложенные в диссертационной работе, получены лично автором. Соавторы указаны в соответствующих статьях и тезисах.

Апробация результатов исследования. Материалы диссертации были доложены и обсуждены на заседании отделения Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов в Санкт-Петербурге и Ленинградской области (Санкт-Петербург, 2017) и конференциях: Съезд Научного общества гастроэнтерологов России (Санкт-Петербург, 2015 и 2017), XV Конгресс детских инфекционистов России "Актуальные вопросы инфекционной патологии и

вакцинопрофилактики" (Москва, 2016), XIX Всероссийская медико-биологическая конференция молодых исследователей "Фундаментальная наука и клиническая медицина" (Санкт-Петербург, 2016), 9th Probiotics, Prebiotics & New Foods - for microbiota and human health. Nutraceuticals & Botanicals (Roma, 2017), Tagung der DVG-Fachgruppe „Physiologie und Biochemie“ (Berlin, 2016), 95th Annual Meeting of the German Physiological Society (Lubeck, 2016), 25th meeting of the European Intestinal Transport Group (Bad Herrenalb, 2013), EMBO Meeting (Nice, 2012), 7th Young European Scientist Meeting (Porto, 2012). По теме диссертации опубликованы 3 статьи в журналах, входящих в список ВАК, и 10 тезисов докладов.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, глав о методических приемах, экспериментальных исследованиях и их обсуждений, выводов, списка цитируемой литературы. Работа изложена на 109 страницах печатного текста, имеет 1 таблицу и иллюстрирована 30 рисунками. В списке цитируемой литературы приведено 178 источников.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования. В работе использовали самцов крыс Вистар массой 180-250 г ($n = 100$). Исследования выполняли в соответствии со стандартами, принятыми организациями по работе с лабораторными животными FELASA и RusLASA. Для наркотизирования крыс использовали препарат Золетил-100 в дозировке 150 мг/кг массы тела животного, при этом летальная доза препарата составляла 300 мг/кг. Эксперименты были проведены на ткани тощей кишки.

Поддержание и работа с культурой клеток линии ИРЕС-J2. Для исключения влияния других типов клеток, образующих стенку кишки, в качестве модели кишечного эпителия использовали клетки линии ИРЕС-J2. Клетки культивировали на фильтрах Millicell (по четыре фильтра) диаметром 10 мм в пластиковых чашках Петри диаметром 3,5 см (NUNC, США) в среде DMEM/Hams F12-Mix (Biocrom, Германия). Клетки культивировали при 37°C в атмосфере, содержащей 5% CO₂. Для определения конфлюентности монослоя клеток измеряли трансэпителиальное сопротивление (Вольтметр Millicell-ERS, США) через каждые двое суток в течение всего срока культивирования. Для экспериментов использовали 14-15-суточную культуру клеток ИРЕС-J2, так как в этот период трансэпителиальное сопротивление достигало требуемого уровня (≈ 1 кОм).

Регистрация электрофизиологических характеристик ткани кишки и культуры клеток в камере Уссинга. Трансэпителиальное сопротивление измеряли в камере Уссинга. Камера представляет собой цилиндр из плексиглаза, состоящий из двух

половин, между которыми помещается ткань. Таким образом, создаются условия, позволяющие изучать влияние веществ на препарат с апикальной или базальной стороны клеток. Каждая половина камеры сообщалась с отдельным стеклянным резервуаром. Стеклянный резервуар имел водяную рубашку для контроля температуры омывающего раствора (37°C) и порт для аэрации карбогеном (95% O₂ и 5% CO₂). Объем циркулирующего раствора в резервуаре составляла 5 мл. Во всех экспериментах для работы использовали раствор Кребса-Рингера (ммоль/л): 119 NaCl, 5 KCl, 1,2 MgCl₂·6H₂O, 25 NaHCO₃, 0,4 NaH₂PO₄·H₂O, 1,6 Na₂HPO₄·7H₂O, 1,2 CaCl₂ (Sigma Aldrich, Германия). В ходе эксперимента в камеру Уссинга с апикальной стороны добавляли липополисахарид и холерный токсин в концентрации 20 мкг/мл и 1 мкг/мл, соответственно. Для изучения трансэпителиального сопротивления регистрировали изменение напряжения в ответ на ток величиной 10 мкА. Трансэпителиальное сопротивление рассчитывается согласно закону Ома ($R=U/I$). Полученное значение корректировали на площадь исследуемой ткани (Ом·см²).

Регистрация электрофизиологических параметров начиналась через 20 минут после установки ткани в камеру. Данное время необходимо для стабилизации характеристик эпителия.

Исследование парацеллюлярного транспорта с использованием флуоресцеина натрия. Для исследований ткань тощей кишки крысы и линию клеток IPEC-J2 помещали в камеру Уссинга. После установки препаратов в опытные группы с мукозной стороны добавляли липополисахарид и холерный токсин в концентрациях 20 мкг/мл и 1 мкг/мл, соответственно. После начала эксперимента 50 мкл раствора с апикальной стороны изымали и добавляли туда 50 мкл раствора, содержащего маркер — флуоресцеин натрия (Sigma Aldrich, Германия). Затем отбирали раствор с базальной стороны и использовали его для определения интенсивности сигнала маркера на флуориметре Cary Eclipse (Agilent, США). Расчет коэффициента проницаемости осуществляется по формуле: $P_{app} = (dQ / dt) / (A \cdot C_0)$, где dQ / dt – концентрация маркера в растворе с серозной стороны после окончания эксперимента (моль/с); A – площадь исследуемого участка ткани (см²); C_0 – концентрация маркера в растворе с мукозной стороны в начальный момент времени (моль/л); Учитывая соотношение 1 л = 1000 см³, размерность проницаемости выражается в см/с.

Электронная микроскопия. Для получения ультратонких срезов ткань фиксировали 2,5%-ым раствором глутаральдегида в растворе Хенкса (pH = 7,0) в течение 2 ч при температуре 4°C. Затем отмытые раствором Хенкса пробы подвергали вторичной фиксации 1%-ым раствором четырехокси осмия (OsO₄) на основе того же раствора Хенкса в течение 2 ч при температуре 4°C. Фиксированные OsO₄ клетки после отмытки раствором Хенкса помещали в 2%-ый раствор уранилацетата на ацетатном буфере (pH=5,2) при 40°C на 1 час.

Отмытые ацетатным буфером препараты обезвоживали в серии этиловых спиртов возрастающей концентрации, в смеси спирта и ацетона, в ацетоне, затем заливали в смолу Spurr для полимеризации материала. Срезы готовили на ультратоме LKB-8800 (LKB, Швеция). Окраску срезов проводили по методу Reynolds уранилацетатом и цитратом свинца. Препараты просматривали в световом и трансмиссионном электронном микроскопе JEM-100С (JEOL, Япония) (Рыбальченко О.В., 2006).

Плотность микроворсинок в контроле, а также при действии липополисахарида и холерного токсина оценивали, подсчитывая их число на расстоянии 1 мкм апикальной поверхности клетки. Анализ площади межклеточного пространства проводили с использованием программы ImageJ, которая позволяет получить числовую оценку площади заданной области в цифровом выражении.

Определение содержания белков плотных контактов в мембранной фракции клеток стенки тощей кишки и клеток культуры ИРЕС-J2 методом Вестерн-блот. При подготовке проб белка для Вестерн-блота ткань сегментов помещали в стеклянную колбу и добавляли 1 мл стандартного лизирующего буфера для мембранных белков с ингибитором протеаз Complete (Boehringer, Mannheim, Германия). Суспензию центрифугировали в течение 5 мин при 200g и 43000g (4°C) для разделения фракций белков мембраны и цитоплазмы клеток. В работе использовали реагент Пирса (Pierce, Rockford, Ill., США). В спектрофотометре (Tecan Spectra, Австрия) при облучении лучами с длиной волны 562 нм автоматически определялась концентрация мембранных белков в исследуемой пробе. На основе полученных данных рассчитывали объем раствора мембранных белков, необходимый для электрофореза в полиакриламидном геле. Для разделения белков по молекулярной массе проводили электрофорез в 12,5% полиакриламидном геле в течение 120 мин при напряжении 100 В. Электроперенос белков на мембрану проходил в течение 60 мин при постоянном напряжении 100 В. Для иммунодетекции белков мембраны последовательно инкубировали в блокирующем растворе (TBS, 5% сухое молоко); в растворе первичных антител к различным клаудинам (1:1000) (MoViTec, Германия); в растворе вторичных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена (1:1000) (MoViTec, Германия). Детекцию и идентификацию белков проводили в анализаторе изображений LAS-1000 (Fujifilm, Япония). Для каждого опыта определяли плотность β -актина (1:5000) как внутреннего контроля. Для сравнения анализа интенсивности сигналов всех клаудинов, экспрессия которых была обнаружена в эпителии тощей кишки крысы, использовался метод денситометрии. Плотность сигнала в контроле принималась за 100%. Анализ изображений проводился с помощью программного обеспечения AIDA Raytest, 2.5 (Straubenhardt, Германия).

Статистическая обработка результатов. Статистическую обработку полученных результатов выполняли в программе прикладного статистического анализа Statistica 8. Обработку экспериментальных данных сравнения влияния воздействия липополисахарида, холерного токсина на трансэпителиальное сопротивление ткани и клеток, уровень различных клаудинов, количество микроворсинок и межклеточное пространство энтероцитов, проницаемость молекул флуоресцеина натрия проводили с использованием статистического непараметрического критерия Манна-Уитни для небольших выборок и t-теста Стьюдента для больших выборок. Полученные результаты представлены в виде среднего \pm ошибка среднего. Уровень значимости $p < 0,05$ принимали как статистически значимый.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Трансэпителиальное сопротивление эпителия тощей кишки и клеток линии ИРЕС-J2 под действием холерного токсина и липополисахарида. Сравнение изменения относительной величины трансэпителиального сопротивления (исходное значение принято за 100%) показало, что холерный токсин на 60-й, 90-й и 120-й минуте вызывает достоверное снижение сопротивления по сравнению с контрольными значениями на 15%, 21% и 25%, соответственно ($p < 0,05$; $n=12$; U-критерий Манна-Уитни) (рис.1А).

Применение буметанида (0,01 mM) с базолатеральной стороны клеток на фоне действия холерного токсина привело к достоверному снижению тока «короткого замыкания» с 138 ± 28 до 96 ± 26 мкА/см² ($p < 0,05$; $n=5$; U-критерий Манна-Уитни). Теофиллин (10 mM) вызывал противоположную реакцию. При его внесении в инкубационный раствор на фоне действия холерного токсина происходило увеличение тока короткого замыкания с 51 ± 11 до 81 ± 18 мкА/см² ($p < 0,05$; $n=5$; U-критерий Манна-Уитни).

Сравнение изменения относительной величины трансэпителиального сопротивления (исходное значение принято за 100%) показало, что холерный токсин на 210-й минуте вызывает достоверное снижение сопротивления линии клеток ИРЕС-J2 по сравнению с контрольными образцами ($p < 0,01$; $n=6$; U-критерий Манна-Уитни) (рис.1Б).

Анализ относительной величины трансэпителиального сопротивления эпителия кишки свидетельствует, что липополисахарид не вызывает изменения его величины в эпителии кишки по сравнению со значениями в контрольных образцах ткани (рис.1В).

Относительная величина трансэпителиального сопротивления свидетельствует, что липополисахарид не вызывает его изменения в линии клеток ИРЕС-J2 по сравнению со значениями в контрольных образцах ткани (рис.1Г).

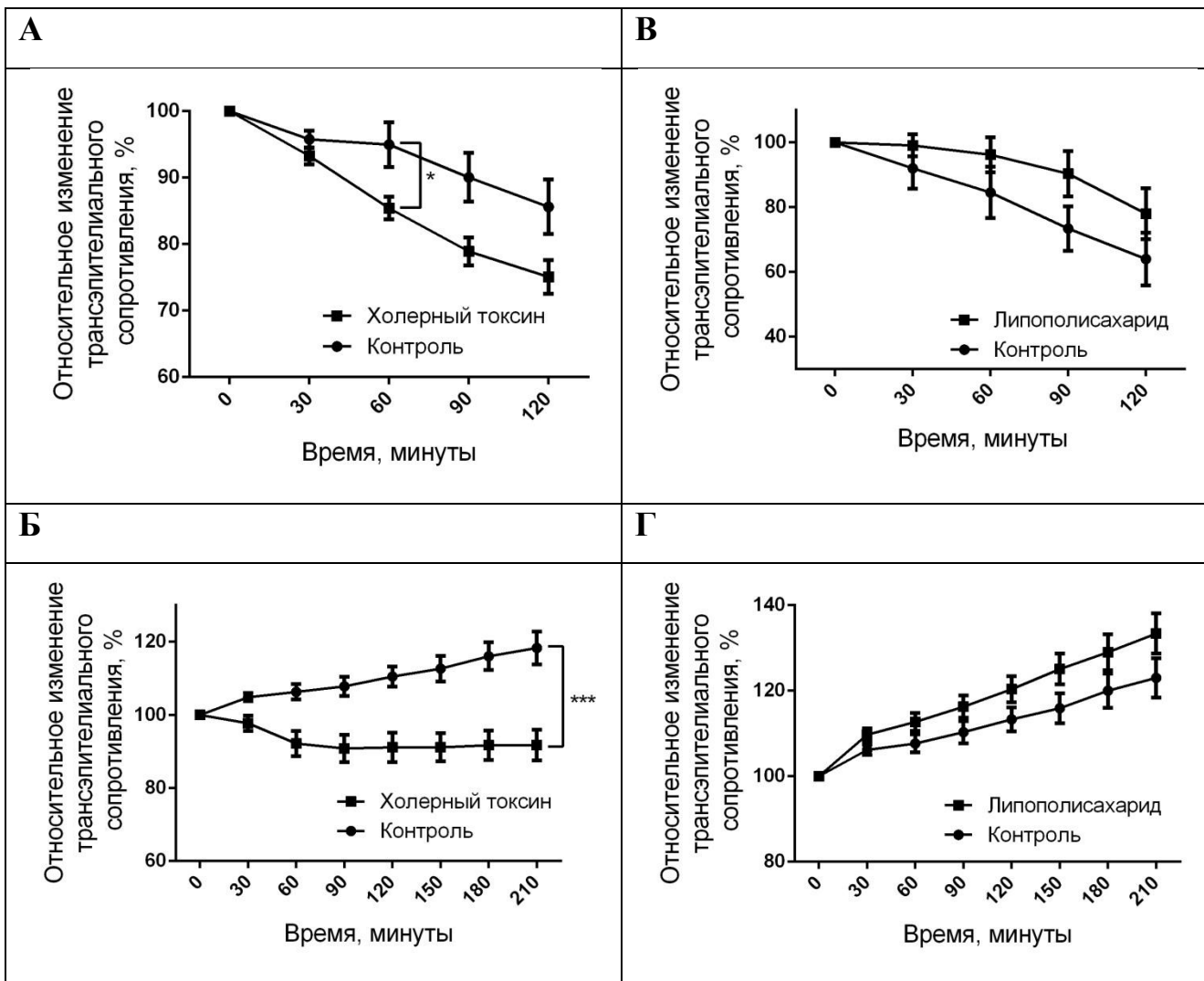


Рис.1. Влияние холерного токсина и липополисахарида на относительное изменение трансэпителиального сопротивления эпителия тощей кишки (А, В) и клеток линии ИРЕС-J2 (Б, Г)
* – $p \leq 0,05$; А,Б- относительно контрольного значения при действии холерного токсина.

Изучение проницаемости слизистой оболочки тощей кишки крысы и линии клеток ИРЕС-J2 при действии холерного токсина и липополисахарида для флуоресцеина натрия. Проницаемость флуоресцеина в контрольных препаратах кишки составила $2,9 \pm 1,9 \cdot 10^{-3}$ см/с ($n=7$). Действие холерного токсина с апикальной стороны клеток привело к достоверному изменению проницаемости для молекул маркера. Проницаемость ткани кишки при действии энтеротоксина достигла величины $6,2 \pm 2,6 \cdot 10^{-3}$ см/с ($n=6$), ($p < 0,05$; критерий Манна-Уитни) (рис.2А).

Внесение в среду инкубации с апикальной стороны холерного токсина не приводило к достоверному изменению проницаемости монослоя клеток ИРЕС-J2 относительно значения проницаемости для контрольной группы, составляя $7,8 \pm 0,8 \cdot 10^{-3}$ см/с ($n=63$) и $6,6 \pm 1,2 \cdot 10^{-3}$ см/с ($n=34$), соответственно ($p \geq 0,05$; t-test Стьюдента) (рис.2Б).

В серии опытов на тощей кишке с липополисахаридом проницаемость для флуоресцеина в контрольной группе составляла $5,3 \pm 3,3 * 10^{-3}$ см/с ($n=4$). При добавлении липополисахарида в среду инкубации с апикальной стороны проницаемость достоверно не изменилась. Величина диффузии флуоресцеина была равна $5,6 \pm 4,7 * 10^{-3}$ см/с ($p \geq 0,05$; $n=4$; U-критерий Манна-Уитни) (рис.2В).

Действие липополисахарида на общую проницаемость монослоя клеток IPEC-J2 для молекул флуоресцеина натрия не приводит к достоверным различиям в проницаемости между контрольной и опытной группой ($p \geq 0,05$; t-test Стьюдента) (рис.2Г).

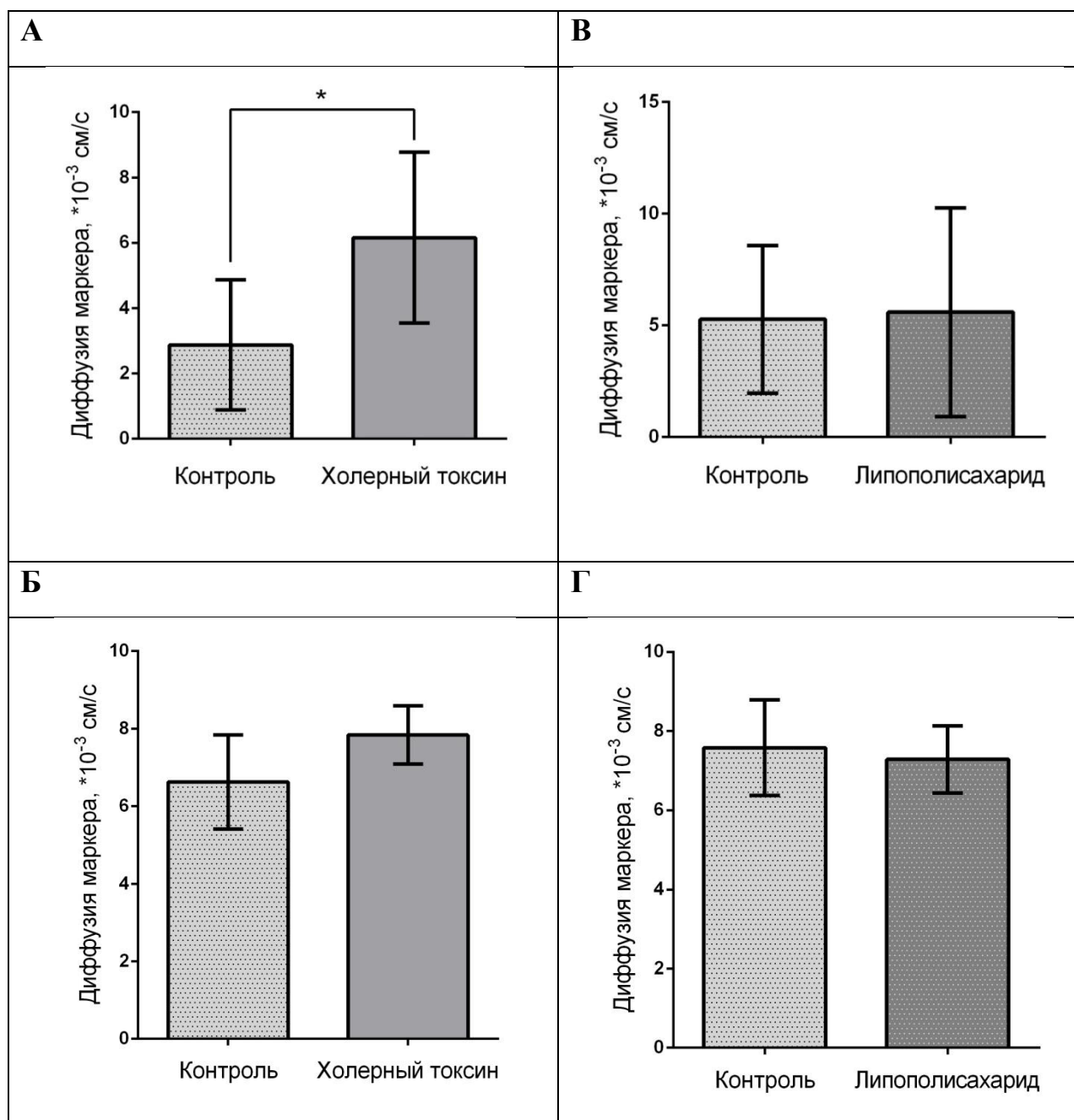


Рис.2. Влияние холерного токсина и липополисахарида на изменение проницаемости маркера в эпителии тощей кишки (А, В) и в клетках линии IPEC-J2 (Б, Г)

* – $p \leq 0,05$ относительно контрольных значений

Анализ ультраструктурных изменений эпителия тощей кишки крысы при действии холерного токсина и липополисахарида.

Ультратонкое строение контрольной ткани тощей кишки крыс. Энтероциты контрольной ткани тощей кишки на ультратонких срезах представляют собой удлиненные клетки характерной цилиндрической формы с овальными ядрами в базальной части. Клетки слизистой оболочки, плотно прилегая друг к другу, формируют тканевой барьер между полостью кишки и межклеточной жидкостью. В верхней части латерального участка плазматической мембраны расположены плотные контакты, которые выглядят как электронно-плотные структуры с характерным кажущимся слиянием плазматических мембран. Межклеточное пространство между соседними клетками выражено слабо, граница между клетками без расширения межклеточного пространства. На апикальной части энтероцитов расположены плотно прилегающие друг к другу микроворсинки, образующие щеточную каемку. Микроворсинки представляют собой цилиндрические выпячивания апикальной части цитоплазмы, окруженные плазматической мембраной. В цитоплазме клеток слизистой оболочки присутствуют митохондрии, эндоплазматический ретикулум, везикулы не обнаружены (рис.3 А,Б,В,Г).

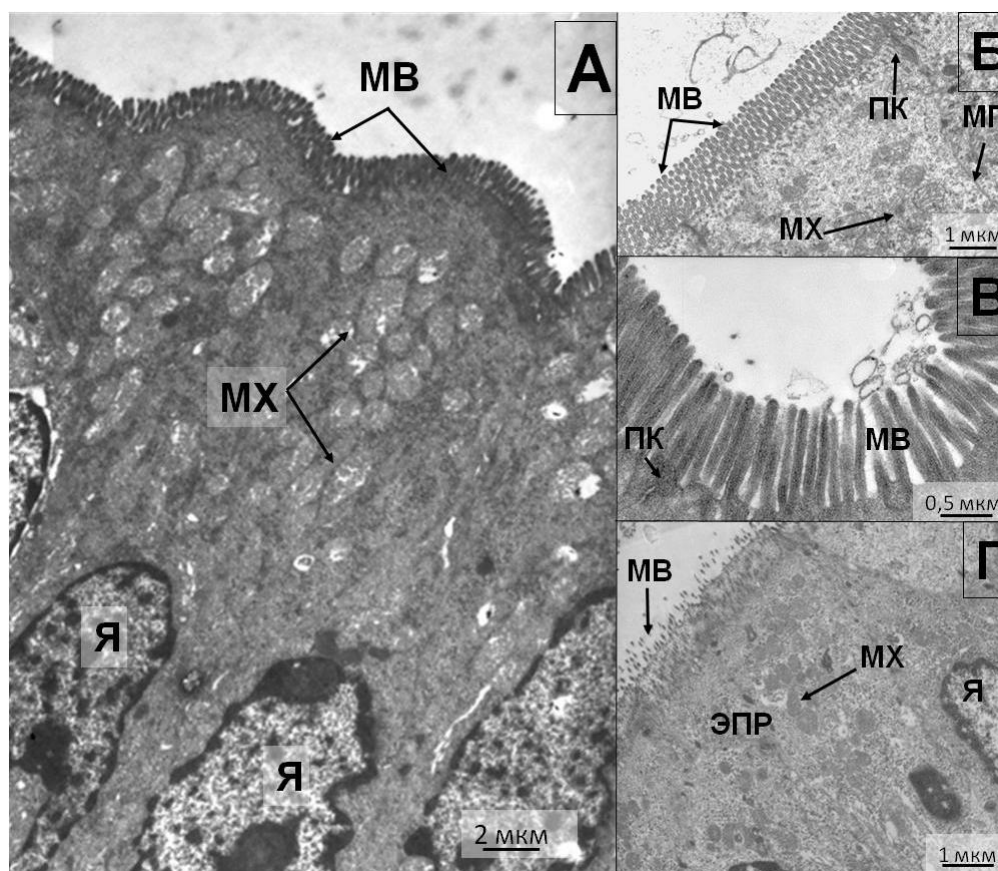


Рис.3А,Б,В,Г. Ультратонкий срез энтероцитов тощей кишки крысы контрольных препаратов. MB-микроворсинки, MX-митохондрии, Я-ядра, ПК-плотные контакты, МП-межклеточное пространство, ЭПР-эндоплазматический ретикулум.

Ультраструктура энтероцитов тощей кишки крысы при действии холерного токсина. При электронно-микроскопическом исследовании действия холерного токсина на клетки слизистой оболочки тощей кишки крысы наблюдали существенное изменение ультраструктуры эпителиального пласта. Несмотря на то, что при воздействии холерного токсина плотные контакты эпителиоцитов визуально не изменялись, объединяя расположенные рядом клетки и сохраняя целостность эпителия, межклеточное пространство расширялось и приобретало новые очертания. Контакт с холерным токсином в течение 2-х часов приводил к значительному увеличению межклеточного пространства между энтероцитами по сравнению с контрольной тканью. В контроле межклеточное пространство между соседними клетками практически не выражено и граница между эпителиоцитами имеет вид ровной линии. Действие холерного токсина значительно изменяло характер границы между эпителиоцитами, которая приобретая форму изогнутых округлых линий, увеличивала межклеточное пространство (рис. 4 А,Б,В,Г). В контрольных образцах площадь межклеточного пространства составляет $0,09 \pm 0,03$ мкм². Показано, что при контакте с холерным токсином площадь межклеточного пространства достоверно увеличивается до $8,5 \pm 4,9$ мкм² (n=5; p \leq 0,01; U- критерий Манна-Уитни) (рис. 6 А).

Контакт холерного токсина с эпителиоцитами приводил к достоверному снижению числа микроворсинок на апикальной поверхности определенной части клеток, по сравнению с контрольной тканью тощей кишки. Плотность микроворсинок в контрольных образцах составляла $6,3 \pm 0,2$ на 1 мкм апикальной поверхности клетки. В то время как при действии холерного токсина этот показатель достоверно снижался и равнялся $2,3 \pm 0,4$ на 1 мкм апикальной поверхности клетки (n=5; p \leq 0,01; U- критерий Манна-Уитни) (рис. 6 Б). Везикулы в цитоплазме клеток слизистой оболочки при обработке холерным токсином не были обнаружены. Однако в цитоплазме энтероцитов тощей кишки крыс в присутствии холерного токсина отмечали значительное увеличение числа митохондрий. В контрольных образцах содержалось 11 ± 1 органеллы, в то время как в клетках после контакта с холерным токсином их число увеличивалось до $19 \pm 0,6$ на 25 мкм² (n=30; p \leq 0,01; t-тест Стьюдента) (рис. 6 В).

Ультраструктура энтероцитов тощей кишки крысы при действии липополисахарида. Плотные контакты не меняются, целостность эпителия сохранена при действии липополисахарида. При воздействии липополисахарида в зоне, приближенной к апикальной поверхности энтероцитов, отмечали появление тучных клеток, заполненных гранулами. На большей части поверхности эпителия в проанализированных препаратах межклеточное пространство заметно не изменялось (рис. 5 А,Б,В,Г). Площадь межклеточного пространства составила $0,06 \pm 0,04$ мкм² и достоверно не отличалась от

контрольных значений ($n=5$; $p \leq 0,05$; U-критерий Манна-Уитни) (рис. 6А). При этом граница между отдельными клетками становилась более заметной.

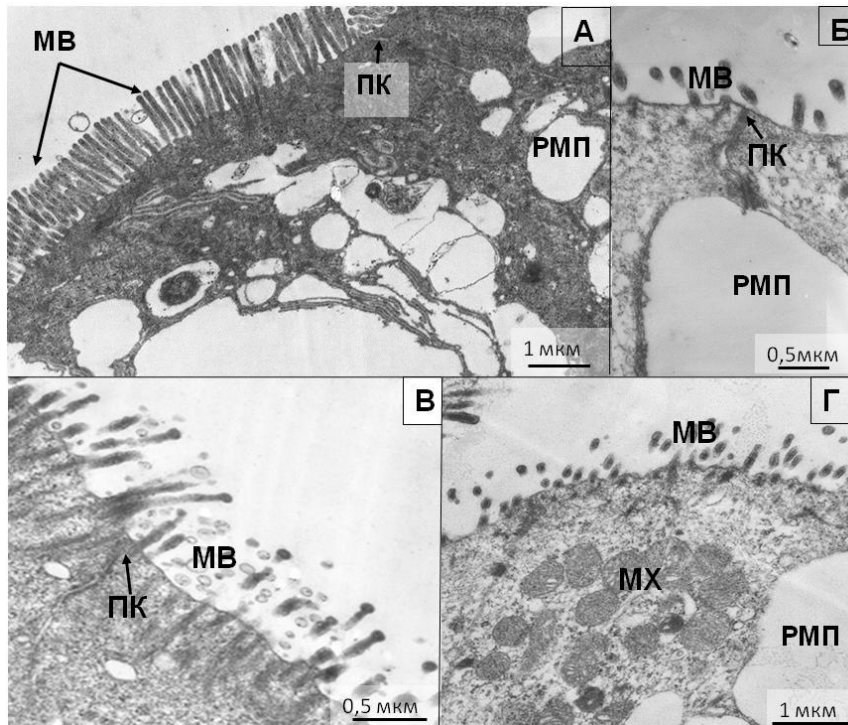


Рис.4 А,Б,В,Г. Ультратонкий срез энтероцитов тощей кишки крысы при действии холерного токсина. МВ-микроворсинки, МХ-митохондрии, ПК-плотные контакты, РМП- расширенное межклеточное пространство

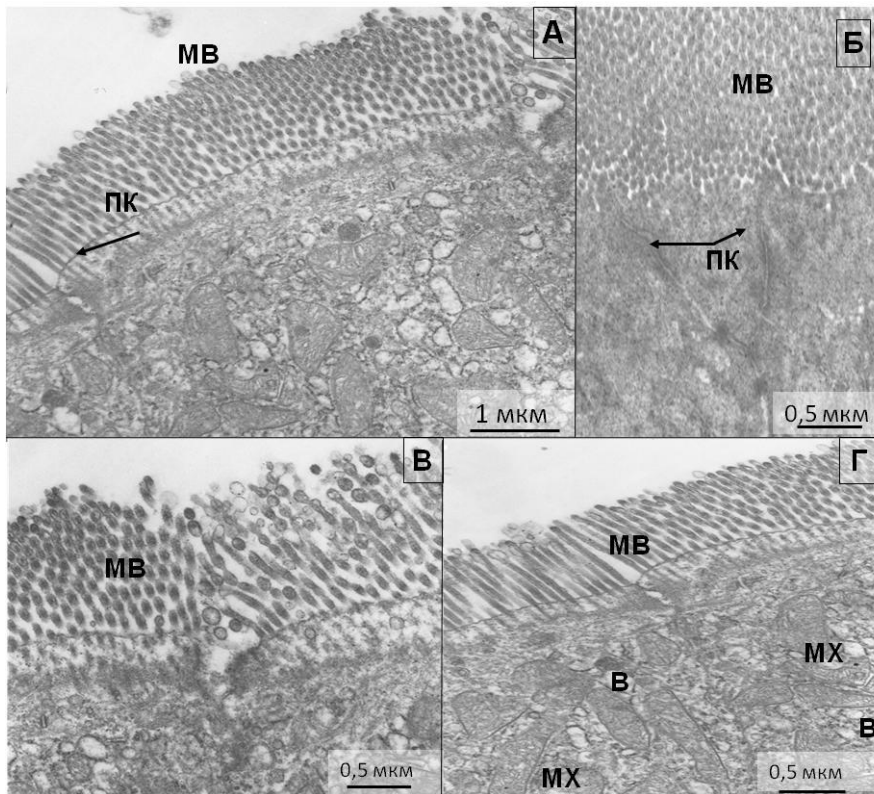


Рис.5 А,Б,В,Г. Ультратонкий срез энтероцитов тощей кишки крысы при действии липополисахарида. МВ-микроворсинки, МХ-митохондрии, ПК-плотные контакты, В- везикулы.

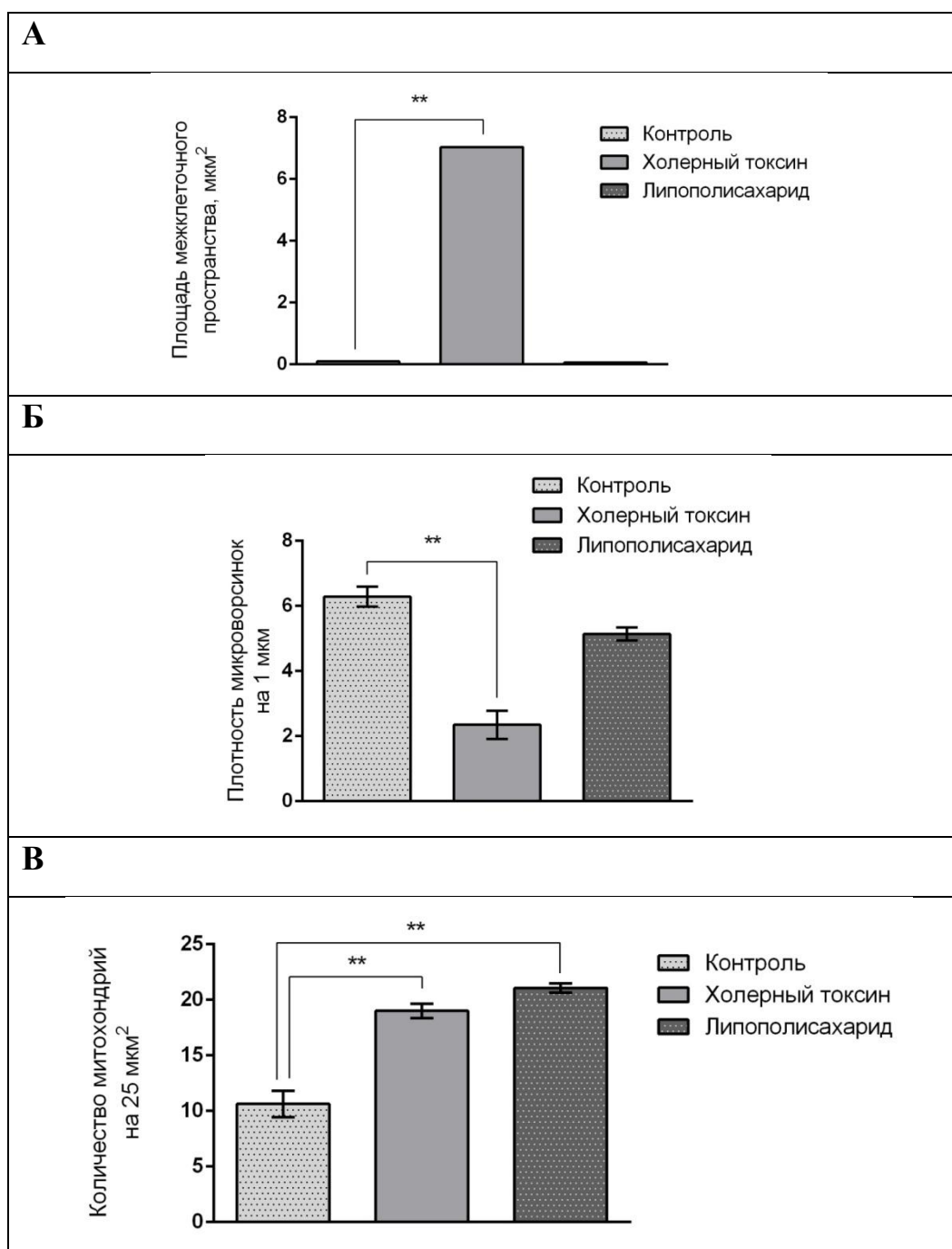


Рис.6 А,Б,В. Изменение площади межклеточного пространства, плотности микроворсинок и количества митохондрий при действии холерного токсина и липополисахарида; * $p < 0,01$ относительно контроля.

Изменение уровня клаудинов в эпителии тощей кишки и в линии клеток IPES-J2 под действием холерного токсина и липополисахарида.

Изменение уровня клаудинов в тощей кишке крысы при действии холерного токсина и липополисахарида. В экспериментах на ткани тощей кишки крысы исследовали клаудины-1,-2,-4,-7,-8. В ходе опытов в данном сегменте ткани была обнаружены все исследуемые белки. Клаудины-1,-4,-8 относятся к подтипу белков, усиливающих барьерные свойства эпителия. В то время, как клаудин-2,-7 обладают противоположным эффектом и представляют собой порообразующие белки. Применение холерного токсина приводило к увеличению уровня порообразующих белков плотных контактов клаудинов-2,-7 по сравнению с контролем. В тоже время воздействие данного энтеротоксина вызывало снижение уровня барьерного клаудина-8 ($n=5$; $p<0,01$; U-критерий Манна-Уитни) (рис.7А). Полученные результаты согласуется с представлениями о действии холерного токсина, как потенциального агента, повышающего проницаемость эпителия. При применении липополисахарида было отмечено увеличение уровня сигнала клаудина-2 и увеличение сигнала клаудина-4 ($n=3$; $p<0,01$; U-критерий Манна-Уитни) (рис.7А)

Изменение уровня клаудинов в линии клеток IPES-J2 при действии холерного токсина и липополисахарида. В линии клеток исследовали клаудины- 1,-2,-4,-7,-8. В ходе опытов в линии клеток были обнаружены все исследуемые белки. Применение холерного токсина и липополисахарида приводило к достоверному снижению уровня клаудина-7, который относится к классу белков плотных контактов, образующих поры ($n=5$; $p<0,01$; U-критерий Манна-Уитни) (рис.7Б).

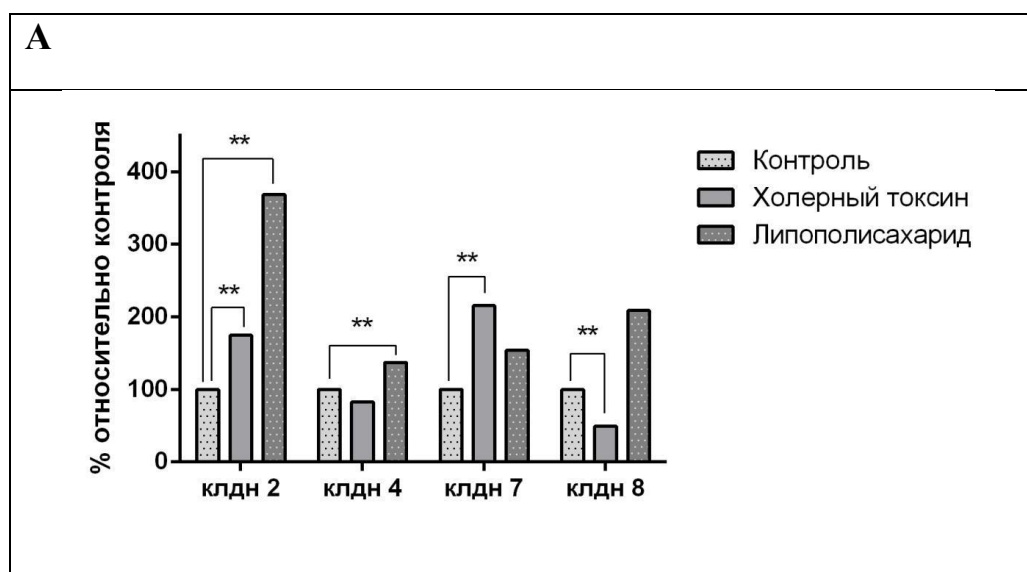


Рис. 7 А. Изменение уровня клаудинов в эпителии тощей кишки при действии холерного токсина и липополисахарида. По оси ординат — относительное изменение уровня белков, %. По оси абсцисс — исследуемые клаудины; * $p<0,01$ относительно контроля.

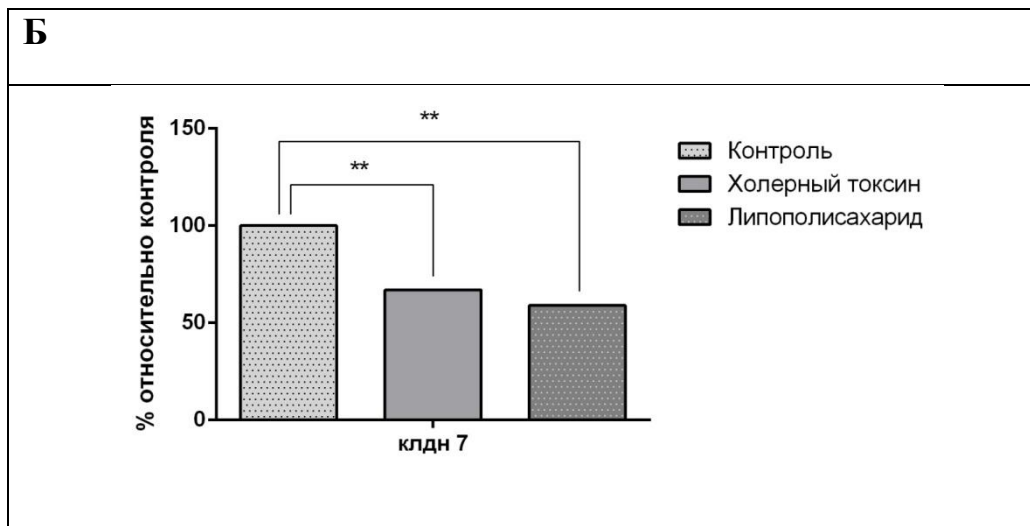


Рис. 7 Б. Изменение уровня клаудинов в линии клеток IPEC-J2 при действии холерного токсина и липополисахарида. По оси ординат — относительное изменение уровня белков, %. По оси абсцисс — исследуемые клаудины; * $p < 0,01$ относительно контроля.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ механизмов регуляции парацеллюлярного транспорта напрямую связан с исследованием барьерных свойств эпителия, определяемых комплексом белков плотных контактов в апикальной части слизистой оболочки и соединяющих соседние клетки. Избирательная проницаемость эпителия напрямую зависит от молекулярного состава белков плотных контактов эпителия, обеспечивающих развитие эпителиального транспортного фенотипа и создающих барьер для движения ионов и веществ по межклеточному пути. Пробиотические и патогенные бактерии оказывают влияние на барьерные функции слизистой оболочки тощей кишки крыс, воздействуя на клетки эпителиоцитов различными метаболитами, в том числе токсинами. Впервые проведенное комплексное исследование воздействия холерного токсина и липополисахарида позволило установить различие в характере изменения барьерных свойств, происходящих в эпителии тощей кишки при контакте с экзотоксином и эндотоксином. Известно, что холерный токсин вызывает увеличение уровня белков плотных контактов, образующих межклеточный канал для воды и ионов натрия, способствуя диффузии ионов натрия и перемещению воды. Однако приоритетными данными настоящей работы являются результаты по установлению факта о том, что холерный токсин изменяет уровень белков плотных контактов, вызывая снижение сопротивления клеток. При этом, результаты, полученные при воздействии липополисахарида с апикальной стороны эпителия тощей кишки и клеток линии IPEC-J2 свидетельствуют об отсутствии изменений трансэпителиального сопротивления. В

дополнение к этому электронно-микроскопическое исследование ультраструктуры эпителия тощей кишки крыс при воздействии холерного токсина свидетельствует о морфо-функциональных изменениях в слизистой оболочке, характерных для активации транспорта ионов и воды.

Невыявленные на ультратонком уровне деструктивные изменения в клетках слизистой оболочки в виде расширения межклеточного пространства и нарушений в строении плотных контактах энтероцитов при воздействии липополисахарида являются характерным отражением отсутствия признаков трансэпителиального перемещения ионов и воды. Наибольший интерес вызывают полученные данные о молекулярном составе плотных контактов в ткани эпителия тощей кишки крыс при воздействии исследуемых токсинов. Отмеченное увеличение уровня порообразующего клаудина-2,-7 и уменьшение клаудина-8, обладающего барьерными свойствами при действии на эпителиоциты холерного токсина, отличается от влияния на слизистую оболочку липополисахарида, который приводит к увеличению содержания в плотных контактах эпителиоцитов клаудина-4, клаудина-2.

Таким образом, исследование спектра белков плотных контактов в слизистой оболочке тощей кишки создает возможности для прогнозирования состояния свойств эпителия, измененные барьерные функции которого могут повлечь за собой трансформацию его свойств, проявляющуюся в нарушении проницаемости для воды, ионов и, в конечном итоге, привести к неконтролируемой транслокации бактерий из собственного им биотопа.

ВЫВОДЫ

1. Применение холерного токсина с апикальной стороны эпителия тонкой кишки крысы и монослоя клеток ИРЕС-J2 приводит к достоверному снижению трансэпителиального сопротивления. Проницаемость для флуоресцеина натрия в ткани тощей кишки при инкубации с холерным токсином достоверно увеличилась по сравнению с контролем.
2. Применение липополисахарида с апикальной стороны эпителия тощей кишки и клеток линии ИРЕС не вызывало изменения трансэпителиального сопротивления и проницаемости для флуоресцеина натрия относительно контрольных значений.
3. Электронно-микроскопический анализ ультраструктуры эпителия тощей кишки крыс в области плотных контактов показал, что воздействие холерного токсина приводит к достоверному увеличению межклеточного пространства между энтероцитами и снижению числа микроворсинок.
4. На ультратонком уровне показано, что воздействие липополисахарида на эпителий тощей кишки крыс не приводит к визуально различимым расширениям межклеточного

пространства, при этом деструктивных изменений в плотных контактах энтероцитов не обнаружено. Наблюдается появление везикул в цитоплазме эпителия и тучных клеток в подслизистой оболочке кишки крысы.

5. Холерный токсин, действуя на эпителий тощей кишки крыс, приводит к достоверному увеличению содержания порообразующих клаудина-2,-7 и уменьшению клаудина-8, обладающего барьерными свойствами. Анализ уровня клаудинов в клеточной линии IPES-J2 при действии холерного токсина показал снижение содержания клаудина-7.
6. Действие липополисахарида изменяет уровень клаудинов в клетках эпителия тощей кишки крыс и приводит к увеличению клаудина-2 и клаудина-4. Липополисахарид в клетках линии IPES-J2 вызывал снижение уровня клаудина-7.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах, входящих в список ВАК:

1. Вишневская О. Н., Рыбальченко О. В., Ларионов И. В., Орлова О. Г., Марков А. Г. Сравнительный анализ плотных контактов эпителия тощей кишки крыс при действии липополисахарида и холерного токсина // Ж. микробиол. эпидемиол. иммунобиол.- 2016.- № 2. - С. 3-9
2. Вишневская О.Н., Бурдин Д.В., Горшков А.Н., Грефнер Н.М., Марков А.Г. Влияние протамина на экспрессию белков плотных контактов в линиях клеток Caco-2 и MDCK I // Росс. физиол. журнал им. и.м. Сеченова.- 2013. - Т. 99, № 1. — P. 81-91.
3. Рыбальченко О.В., Орлова О.Г., Захарова Л.Б., Вишневская О.Н., Марков А.Г. Влияние пробиотических бактерий и липополисахаридов на плотные контакты эпителиоцитов тощей кишки крыс // Ж. микробиол. эпидемиол. иммунобиол.- 2017.- № 6.- С. 80-87.

Тезисы:

4. Rybalchenko O., Vishnevskaya O., Kapustina V., Markov A., Amasheh S., Aschenbach J. R. ACTION OF CHOLERA TOXIN AND LIPOPOLYSACCHARIDE ON TIGHT JUNCTIONS OF RAT SMALL INTESTINAL EPITHELIUM // Tagung der DVG-Fachgruppe „Physiologie und Biochemie“ 30. März bis 01. April 2016 in Berlin — Wetter, Germany, — 2016. — P. 31-32
5. Rybalchenko O., Vishnevskaya O., Orlova O., Markov A., Aschenbach J. R., Amasheh S. Comparative analysis of cholera toxin and lipopolysaccharide effects on rat small intestinal epithelial cells by TEM // Abstracts of the 95th Annual Meeting of the German Physiological Society 3–5 March 2016, Lübeck, Germany — Lübeck, Germany, — 2016. — P. 133

6. Vishnevskaya O., Burdin D., Grefner N., Gorshkov A., Markov A. Protamine and cholera toxin action on tight junction proteins in Caco-2 cells // Abstracts of the 25th meeting of the European Intestinal Transport Group Bad Herrenalb, Germany on 11-14th April 2013 — Bad Herrenalb, Germany, — 2013. — Vol. 69, — P. 673
7. Burdin D., Vishnevskaya O., Gorshkov A., Grefner N., Markov A. Protamine and cholera toxin action on tight junction proteins in polarized MDCK cells // EMBO Meeting, 2012. Nice, France — Nice, — 2012.
8. Vishnevskaya O., Burdin D., Grefner N., Gorshkov F., Markov A. Protamine and Cholera toxin alter the expression of tight junction proteins in Caco-2 cells // 7th Meeting. 2012. Porto, Portugal — Porto, — 2012.