

САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

*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

диссертация

на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
д.б.н. проф. А.Г. Марков  
д.б.н. проф. О.В. Рыбальченко

Санкт-Петербург

2018

## ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ .....	4
ВВЕДЕНИЕ .....	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	11
1.1. Клеточный состав эпителия тонкой кишки.....	11
1.2. Виды транспорта в эпителии .....	13
1.3. Плотные контакты, строение и состав.....	15
1.4. Клеточные культуры и линии, как модели для изучения эпителия .....	37
1.5. Микробиота желудочно-кишечного тракта и вещества, изменяющие проницаемость эпителия .....	41
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	53
2.1. Общие подходы к организации экспериментов на животных .....	53
2.2. Поддержание и работа с культурой клеток линии IPES-J2.....	55
2.3. Регистрация электрофизиологических характеристик ткани кишки и культуры клеток в камере Уссинга .....	56
2.4. Исследование парацеллюлярного транспорта с использованием флуоресцеина натрия .....	58
2.5. Электронная микроскопия .....	59
2.6. Определение содержания белков плотных контактов в мембранной фракции клеток стенки тощей кишки и клеток культуры IPES-J2 методом Вестерн-блот.....	59
2.7. Фармакологические соединения .....	62
2.8. Статистическая обработка результатов .....	63
ГЛАВА 3. ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ТОЩЕЙ КИШКИ КРЫСЫ И ЛИНИИ КЛЕТОК IPES-J2 ПРИ ДЕЙСТВИИ ХОЛЕРНОГО ТОКСИНА И ЛИПОПОЛИСАХАРИДА .....	64
3.1. Трансэпителиальное сопротивление эпителия тощей кишки и клеток линии IPES-J2 под действием холерного токсина и липополисахарида .....	64
3.2. Изучение проницаемости слизистой оболочки тощей кишки крысы и линии клеток IPES-J2 при действии холерного токсина и липополисахарида для флуоресцеина натрия .....	71

ГЛАВА 4. ИССЛЕДОВАНИЕ СТЕНКИ ТОЩЕЙ КИШКИ КРЫСЫ ПРИ ДЕЙСТВИИ ХОЛЕРНОГО ТОКСИНА И ЛИПОПОЛИСАХАРИДА МЕТОДОМ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ .....	74
4.1. Ультратонкое строение контрольной ткани тощей кишки крыс .....	74
4.2. Ультраструктура энтероцитов тощей кишки крысы при действии холерного токсина.....	76
4.3. Ультраструктура энтероцитов тощей кишки крысы при действии липолисахарида .....	77
ГЛАВА 5. ИЗМЕНЕНИЕ УРОВНЯ КЛАУДИНОВ В ЭПИТЕЛИИ ТОЩЕЙ КИШКИ И В ЛИНИИ КЛЕТОК IPES-J2 ПОД ДЕЙСТВИЕМ ХОЛЕРНОГО ТОКСИНА И ЛИПОПОЛИСАХАРИДА.....	82
5.1. Изменение уровня клаудинов в тощей кишке крысы при действии холерного токсина и липополисахарида.....	82
5.2. Изменение уровня клаудинов в линии клеток IPES-J2 под действием холерного токсина и липополисахарида.....	82
ОБСУЖДЕНИЕ .....	85
ВЫВОДЫ.....	90
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	91

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ADP – adenosine diphosphate  
aa- amino acid  
GDP – guanosine diphosphate  
GTP – guanosine triphosphate  
kDa – kilo Dalton  
cAMP – Cyclic adenosine monophosphate  
CD14 – cluster of differentiation 14  
Caco-2 – Human Colon Carcinoma Cell Line  
AF-6 – ALL-1 Fusion partner  
CaR – calcium sensing receptor  
CAR – coxsackie- and adenovirus receptor  
CFTR – cystic fibrosis transmembrane conductance regulator  
CLMP – coxsackie- and adenovirus receptor-like membrane protein  
COP – coatomer protein  
DABCO – 1,4-Diazabicyclo(2,2,2)octane  
DIG – detergentinsoluble glycosphingolipid-rich membrane microdomains  
ECP – eosinophil cationic protein  
ESAM – endothelial cell-selective adhesion molecule  
GAP – GTPase activating protein  
GEF – guanine nucleotide exchange factors  
GLUT-2 – Glucose transporter 2  
GM1 – monosialotetrahexosylganglioside 1  
JACOP – junction-associated coiled-coil protein  
JAM – junctional adhesion molecule  
JEAP – junction-enriched and –associated protein  
LBP – LPS binding protein  
MAGI – membrane-associated guanilate kinase inverted proteins  
MAGUK – membrane-associated guanylate kinase

MDCK – Madin Darby canine kidney cells

MUPP – multi-PDZ protein

PMNP – polymorphonuclear leukocytes protein

PDZ – Psd-95 (Post Synaptic Density Protein), DlgA (Drosophila Disc Large Tumor Suppressor) and ZO1 (Zonula Occludens-1 Protein)

PKA – protein kinase A

PKC – protein kinase C

PP2A – protein phosphatase 2A

SGLT-1– Sodium-glucose transport proteins-1

TLR – Toll-like receptor

WNK – with no K (lysine) protease

ZAK – zipper sterile-Alpha-motif kinase

ZO – zonula occludens

ZOT – zonula occludens toxin

**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 локализацию (Berkes et al., 2003). Физиологическая активность секретируемых 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-J2 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 обсуждениях, 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.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1. Клеточный состав эпителии тонкой кишки

Эпителиальные клетки кишечного тракта выполняют важные функции: всасывание питательных веществ и секреция широкого спектра ферментов. Эпителий тонкой кишки состоит из различных специализированных клеток.

К первому типу клеток можно отнести стволовые клетки. Они представляют собой немигрирующие клетки, у которых нет фиксированного потенциала развития в пределах конкретной ткани. Клетки находятся в основании крипт и могут пролиферировать и дифференцироваться в любые другие типы клеток (Housley et. al., 1994; Powell et. al., 1999). В основании каждой крипты содержится от 4 до 6 стволовых клеток (Freeman, 2008).

Следующий тип – это бокаловидные клетки, основной функцией которых является секреция гликопротеина муцина. Благодаря своей структуре муцин обеспечивает увлажнение поверхности слизистой оболочки кишки для продвижения химуса, формирует барьер для патогенных субстанции и создает проницаемый барьер для питательных веществ (Laboisse et. al., 1996).

Энтероэндокринные клетки имеют широкое основание и зауженную вершину, умеренное число нерегулярно расположенных микроворсинок. В основании клеток в цитоплазме расположены секреторные гранулы. Полагают, что эти клетки через биохимические рецепторы энтероцитов, расположенных на их базально-латеральной мембране, могут управлять функцией энтероцитов (Lentz, 1971).

Клетки Панета представляют собой секреторные клетки трапецевидной формы. Они, как и все клетки, происходят из стволовых клеток, но после дифференцировки мигрируют не на вершину ворсинок, а на дно крипт (Vjerknes et. al., 1981; Cheng et. al., 1969). Клетки Панета играют важную роль в иммунной защите кишки, секретировав различные белки и пептиды, включая антимикробные альфа-дефензины.

Энтероциты – это полярные эпителиальные клетки. Эти клетки связаны друг с другом через комплекс белков плотных контактов, который разделяет апикальные части клеток и их базолатеральные области. Апикальная поверхность клеток, которая обращена в полость кишки, имеет множество микроворсинок. Микроворсинки в совокупности принято называть щеточной каймой. В плазмалемме микроворсинок содержится большое число пищеварительных ферментов, а также элементы транспортных систем и каналы для транспорта ионов. Все перечисленные структуры различаются на апикальных и базолатеральных областях плазматической мембраны энтероцита. Полярность распределения транспортных белков и ионных каналов позволяет функционировать дифференцированному транспорту веществ в разных частях энтероцита. В базолатеральных областях мембраны эпителиальных клеток находятся рецепторы для гормонов, факторов роста и нейротрансмиттеров. С помощью различных регуляторов (от эндогенных внутриклеточных регуляторов до регуляторов центральной нервной системы), среди которых гормоны, нейротрансмиттеры, пептиды и др. (Lentz, 1971), осуществляется ряд функций энтероцита, а именно: дифференциация, миграция, проницаемость, транспорт веществ.

M-клетки представляют собой специализированные эпителиальные клетки, которые находятся в лимфоидных узелках, фолликулах или лимфоидных бляшках. По своему строению M-клетки сильно отличаются от энтероцитов кишки. Щеточная каемка M-клеток состоит из коротких нерегулярных микроворсинок, и привычно толстый слой гликокаликса замещен на более тонкий, чем у энтероцитов. При этом у данного типа клеток отсутствуют характерные для энтероцитов ворсинчатого эпителия кишки гликопротеины апикальной мембраны (Gebert et. al., 1996; Kerneis et. al., 1997). Подобное видоизменение поверхностного аппарата клетки нацелено на обеспечение лучшего доступа и захвата антигенов из просвета кишки.

Интраэпителиальные лимфоциты являются специализированной популяцией Т-лимфоцитов. Они мигрируют из периферической крови в прослойку между базолатеральными мембранами эпителиальных клеток. Данный тип клеток играет важную роль в иммунной защите, осуществляемой слизистой оболочкой тонкой кишки (Lentz, 1971).

## 1.2 Виды транспорта в эпителии

**Трансцеллюлярный транспорт.** По трансцеллюлярному пути вещества транспортируются через апикальную или базолатеральную мембрану эпителиоцитов. В кишке процесс всасывания осуществляется с участием активного и пассивного вида транспорта. Главным фактором в осуществлении пассивного транспорта веществ через эпителий кишки является наличие осмотического и концентрационного градиентов.

У млекопитающих первичные этапы расщепления пищевых биополимеров происходят в полости тонкой кишки при участии ферментов, поступающих в составе панкреатического сока в двенадцатиперстную кишку. Под действием панкреатической  $\alpha$ -амилазы происходит гидролиз промежуточных продуктов распада углеводов до глюкозы, фруктозы и галактозы на поверхности энтероцитов (Ugolev et al., 1985; Тимофеева и др., 2000; Kushak et al., 2005). Конечными продуктами мембранного пищеварения являются моносахариды, которые всасываются посредством трансмембранного транспорта (Уголев и др., 1992; Drozdowski et al., 2006).

В транспорте ионов и молекул через мембрану энтероцитов в кишечном эпителии основную роль играют различные каналы и переносчики. Транспорт глюкозы осуществляется посредством нескольких переносчиков, среди них наиболее известен SGLT-1. Он обеспечивает однонаправленный транспорт глюкозы и ионов  $\text{Na}^+$  (Kim et al., 2006). Градиент концентрации ионов  $\text{Na}^+$  в области апикальной мембраны клеток в направлении от полости к межклеточной среде при динамическом равновесии поддерживается посредством откачивания этих ионов с помощью  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы, которая

локализована в базолатеральной мембране клеток. Таким образом, энергия, которая получается за счет электрохимического градиента ионов  $\text{Na}^+$  на базолатеральной мембране, используется расположенным в апикальной мембране клеток SGLT-1 транспортером для противогradientного переноса через нее глюкозы (Drozdowski et al., 2006).

Показано, что транспорт ионов  $\text{Na}^+$  через мембрану энтероцитов может осуществляться совместно с глюкозой и через другие системы. Одной из них является hCTN3, позволяющая осуществлять перенос вместе с нуклеозидами (Gorraitz et al., 2007). Транспорт  $\text{Na}^+$  может происходить и через  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -обменник (Watanabe et al., 2005).

Одним из наиболее известных транспортеров моносахаридов является GLUT-2 (Thorens et al., 1988). Следует отметить, что транспорт глюкозы с помощью данного транспортера контролируется инсулином (Brot-Laroche et al., 2007). Другой транспортер из данного семейства – это GLUT-5, осуществляющий транспорт продуктов гидролиза углеводов. GLUT-5 находится на апикальной мембране клеток. Он принимает участие в транспорте фруктозы путем облегченной диффузии и ингибируется ее избытком (Burant et al., 1992).

В транспорте  $\text{H}_2\text{O}$  через эпителий ключевую роль играет активный транспорт  $\text{Na}^+$ . Показано, что активный транспорт ионов создает локальный осмотический градиент в пространствах между эпителиальными клетками. Именно это обеспечивает транспорт воды посредством локального осмоса (Loo et al., 2002).

**Парацеллюлярный транспорт.** Показано, что в осуществлении данного вида транспорта большая роль принадлежит белкам плотных контактов. Парацеллюлярный путь транспорта электролитов и воды изучен в меньшей степени по причине того, что молекулярные компоненты плотных контактов были открыты сравнительно недавно (Furuse et al., 1993; Furuse et al., 1998; Martin-Padura et al., 1998). Отдельные белки плотных контактов различаются

по своим свойствам. Одни усиливают барьерные свойства эпителия, другие образуют селективные ионные поры.

Известно, что по парацеллюлярному пути осуществляется транспорт ионов  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$  (Amasheh et al., 2002; Van Itallie et al., 2003; Alexandre et al., 2005; Weber et al., 2001; Fujita et al., 2008). Молекулы органических веществ, а не только ионы, также могут транспортироваться парацеллюлярно. Особую роль в этом играют плотные контакты (Rappenheimer, 2001).

Следует отметить, что межклеточная проницаемость эпителия тонкой кишки в 13 раз выше трансцеллюлярной (Weng et al., 2005). Таким образом, исследование механизмов транспорта по парацеллюлярному пути является наиболее важной и приоритетной областью науки.

### 1.3 Плотные контакты, строение и состав

**Строение и состав плотных контактов.** Плотные контакты представляют собой апикальные межклеточные структуры эпителиальных и эндотелиальных клеток, образующие барьер для движения ионов и веществ по парацеллюлярному пути.

Впервые структура плотных контактов, адгезионных контактов и десмосом была описана с помощью методов электронной микроскопии. Плотные контакты наблюдали как слияния мембран соседних клеток (Farquhar, 1963) (рис.2). Также с помощью методов электронной микроскопии было показано, что в местах соединения мембран двух соседних клеток находится сеть внутримембранных фибрилл (белков плотных контактов) (Staehelin, 1973).

Это дало основания для возникновения так называемой “липидной гипотезы” строения плотных контактов (рис.1), постулирующей о том, что их структурной основой являются цилиндрические мицеллы соседних мембран клетки, в которой полярные головки фосфолипидов ориентированы в центр (Kachar et al., 1982). Более поздние исследования поляризованного

распределения липидных молекул не подтвердили эту точку зрения. Ещё в 1969 году методом замораживания-скалывания было показано, что плотные контакты на электронных репликах имеют вид характерной сети фибрилл, располагающейся между рядом расположенными мембранами (рис.2). Существование этих нитей слабо объяснялось липидной гипотезой строения плотных контактов. Кроме того, выяснилось, что ингибиторы белкового синтеза тормозят формирование плотных контактов в культуре клеток MDCK (Cereijido et al., 1981). Позже в работе (Furuse et al., 1993) было выяснено, что эти фибриллы представляют собой интегральные белки мембраны.

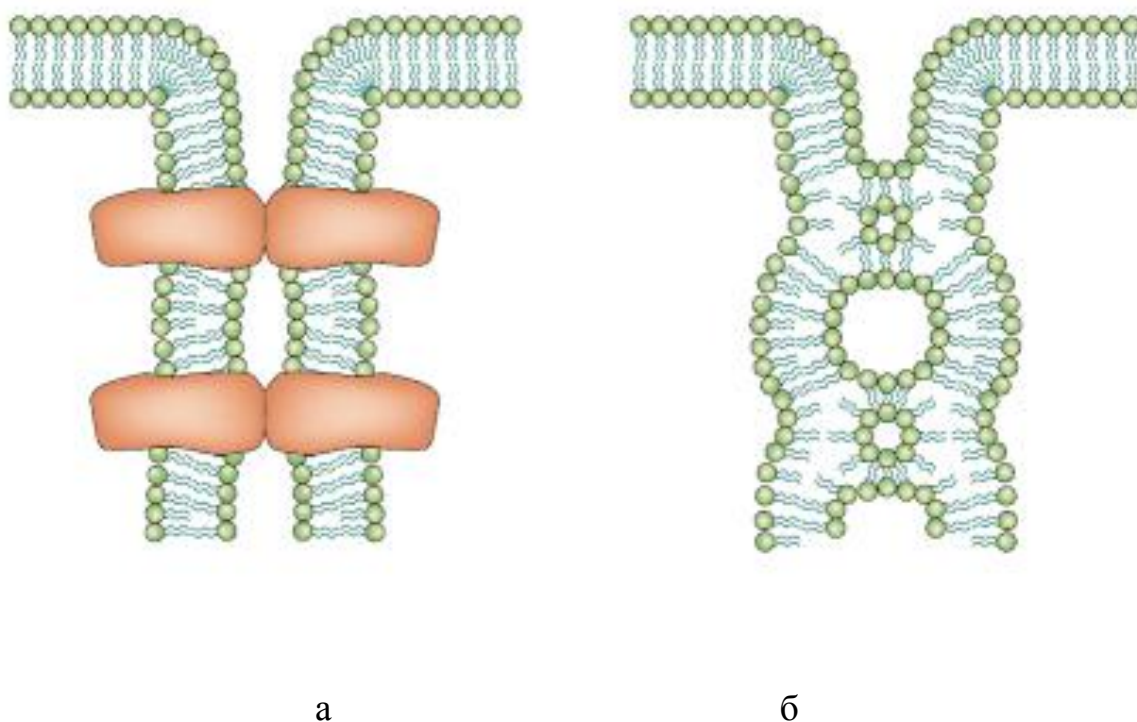


Рис.1. Белковая (а) и липидная (б) модели строения плотных контактов (Tsukita et al., 2001)



Плотные контакты представляют собой мультимолекулярный комплекс. При сборке такого комплекса происходит ряд сложных молекулярных взаимодействий (Contreras et al., 2002). К основным белкам плотных контактов относят интегральные белки мембраны: клаудины и окклюдин (Furuse et al., 1998), трицеллюлин (Ikenouchi et al., 2005; Krug et al., 2009), белки адгезии (JAMs) (Martin-Padura et al., 1998).

C-терминальный домен этих белков взаимодействует с цитоплазматическими белками ZO-1,-2,-3, которые связаны с актиновым цитоскелетом (Matter et al., 2005) (рис. 3).

Семейство клаудинов, в котором насчитывается 27 белков, играют важную роль в поддержании межклеточного барьера (Mineta et al., 2011). Они являются важнейшими регуляторами парацеллюлярного транспорта. Определенные компоненты плотных контактов способны образовывать селективные ионные поры, другие наоборот обеспечивают барьерные свойства эпителия. Было показано, что по плотным контактам транспортируются ионы  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Li}^+$  (Amasheh et al., 2002).

К настоящему времени открыты и другие функции плотных контактов – сигнальная, рецепторная и др. Доказано участие белков плотных контактов в активации и запуске сигнальных каскадов, которые отвечают за полярность клеток, их дифференциацию (Tsukita et al., 2001).

Для дальнейшего рассмотрения функций плотных контактов необходимым представляется понимание роли каждого их компонента в отдельности.

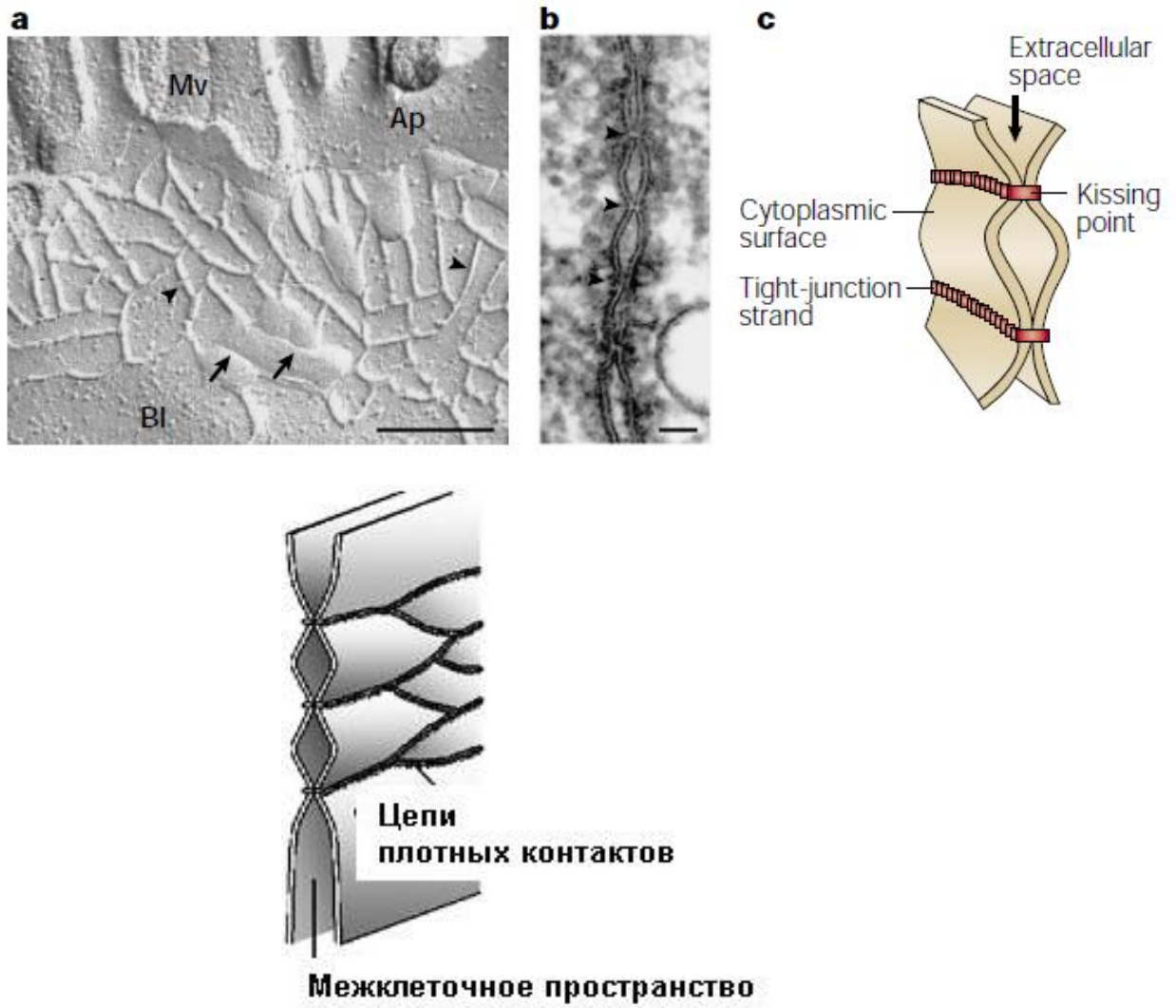
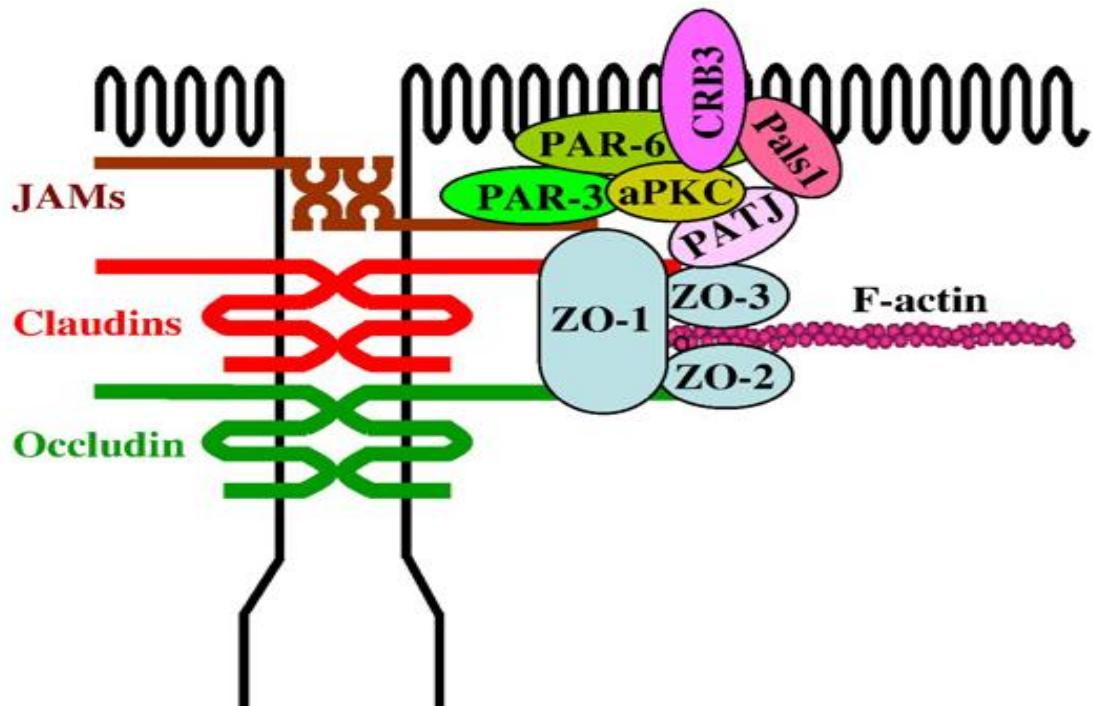


Рис.2. Электронограммы области плотных контактов и их объемное изображение



Трансмембранные белки

Цитоплазматические белки

Рис.3 Молекулярный состав плотных контактов. Три семейства трансмембранных белков плотных контактов – окклюдин, клаудины, белки адгезии (JAMs), а также внутриклеточные белки (Chiba et al., 2007)

**Окклюдин.** При открытии окклюдина Furuse и коллегив 1993 году использовали мембранную фракцию печени цыпленка в качестве антигена для получения моноклональных антител к белку массой 65 кДа в организме мышей. Для того чтобы извлечь белок из мембранной фракции был необходим детергент, что указывало на его трансмембранную природу и дало основания предполагать его возможную локализацию в плотных контактах. Дальнейшие исследования подтвердили эту гипотезу. Структурный анализ показал, что белок состоит из 4 гидрофобных участков и имеет в своем составе две экстраклеточные петли и N- и C-цитоплазматические концы (рис. 4). Было показано, что аминокислотная последовательность первой экстраклеточной петли состоит преимущественно из остатков глицина и тирозина (60%). Открытый белок был назван *occludin* от латинского “*occlude*” (смыкаться).

Позже с помощью методов клонирования и секвенирования была получена более детальная информация о структуре окклюдина птиц. Было выделено 5 различных доменов (А-Е) с различной функциональной спецификой. Заряженные аминокислоты строго располагались в цитоплазматическом С-терминальном домене Е (250 аминокислот) и играли важную роль во взаимодействии окклюдина с цитоплазматическими белками плотных контактов (ZO-1; ZO-2 и др), а экстраклеточные домены В и D имели высокий процент глициновых и тирозиновых остатков (Furuse et al., 1994).

До 1996 года не было данных о наличии гомологичного окклюдину белка в эпителиальных тканях млекопитающих. Вскоре была установлена нуклеотидная последовательность кДНК, кодирующая окклюдин кенгуру, человека, мыши и собаки (Ando-Akatsuka et al., 1996). Аминокислотная последовательность окклюдина различных млекопитающих показывала 90% гомологии.

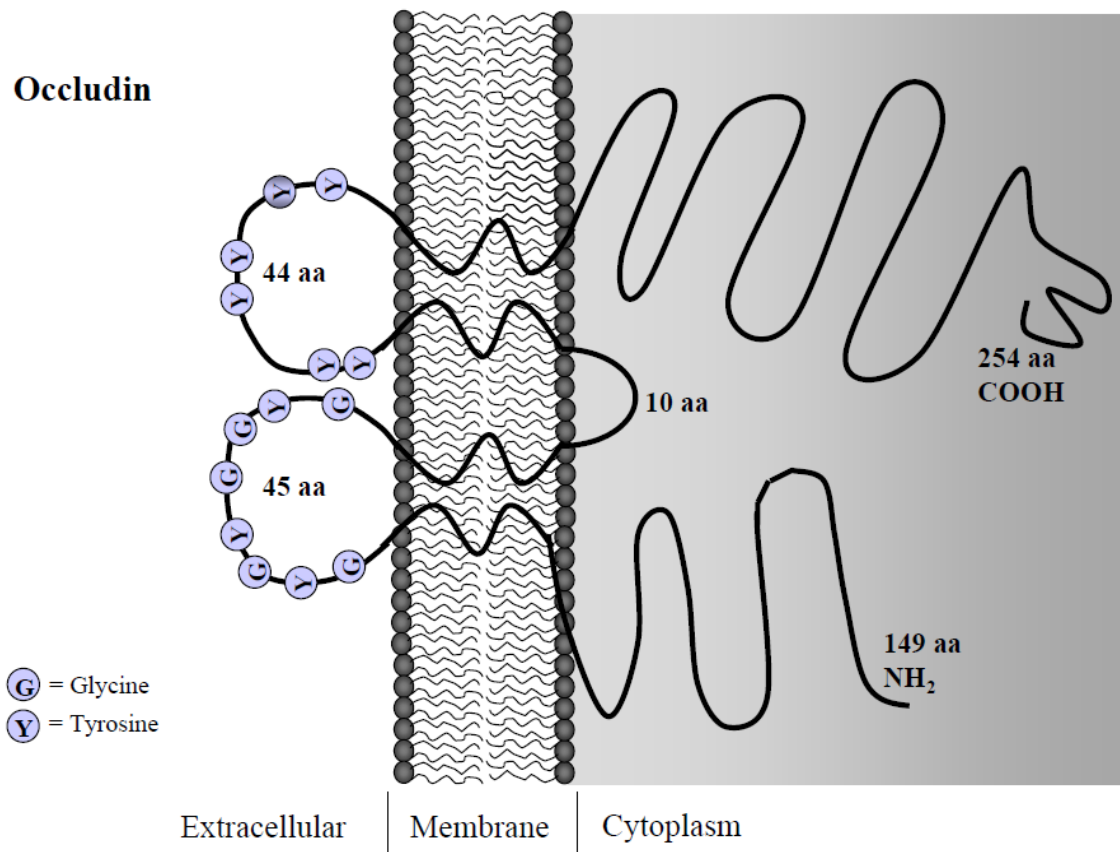


Рис. 4. Структура окклюдина (Feldman et al., 2005)

Позднее были описаны свойства окклюдина в эпителии млекопитающих на всех уровнях транскрипции (Saitou et al., 1997). С помощью метода гибридизации ДНК они выяснили, что ген окклюдина человека расположен на плече пятой хромосомы (5q.13.1) и предсказали наличие нескольких изоформ окклюдина. Методом вестерн-блоттинга было показано наличие окклюдина практически во всех эпителиальных клетках и органах: почке, кожных покровах, легких, печени, кишке, семенниках, что хорошо согласовывалось с наличием плотных контактов в этих тканях.

Эксперименты с введением мутантных форм окклюдина в клетки MDCK (Balda et al., 1996) и CSG120/7 (Vamforth et al., 1999) позволили сделать вывод о роли специфических доменов окклюдина в его функционировании. Так, было высказано предположение о том, что С-терминальный конец окклюдина вовлечен в регуляцию парацеллюлярной проницаемости плотных контактов через взаимодействие с цитоплазматическими белками ZO-1 и ZO-2. В результате экспрессии мутантного окклюдина по N-концу была обнаружена неспособность клеток к формированию полноценного эпителиального барьера. На электронных репликах клеток CSG120/7, экспрессирующих мутантный окклюдин по N-концу были отчетливо видны промежутки и разрывы в сети белковых фибрилл, формирующих плотные контакты (Vamforth et al., 1999). Позднее было продемонстрировано, что для локализации окклюдина в зоне плотных контактов необходима сигнальная последовательность, локализованная во второй экстраклеточной петле (Medina et al., 2000).

Показано, что из-за наличия сигнальной последовательности в С-терминальном домене окклюдин первым доставляется к латеральной мембране, позже к нему присоединяются другие белки, постепенно образуя, таким образом, плотный контакт (Matter et al., 2005). Именно это дало основания использовать окклюдин как удобный маркер плотных контактов. Возможно, окклюдин обладает афинностью к другой молекуле окклюдина, находящейся в мембране соседней клетки, что позволяет сформировать

начальный контакт, в который постепенно будут доставляться другие молекулярные компоненты (Cereijido et al., 2004). С другой стороны, с помощью иммуноэлектронной микроскопии было продемонстрировано, что окклюдин не является решающим белком при формировании белковых цепей плотных контактов. Известно, что эмбриональные стволовые клетки, у которых не экспрессируется окклюдин, формируют морфологически нормальные плотные контакты (Saitou et al., 1998). Более того, эмбрионы мышей, у которых вовсе отсутствовал окклюдин, не имели нарушений структуры и барьерных функций кишечного эпителия. Хотя в ходе постнатального развития у данных животных развивались воспаление и гиперплазия слизистой желудка, отсутствовали цитоплазматические гранулы в клетках, выстилающих протоки слюнных желез, а также атрофировались яички, что позволяет предполагать наличие у окклюдина специфических функций (Schulzke et al., 2005). Существует объясняющая данные факты гипотеза, что окклюдин влияет на структуру белковых цепей плотных контактов после того, как начинается его повышенная экспрессия и увеличивается концентрация в определенных областях мембраны (Matter et al., 2005).

К настоящему моменту известно несколько десятков молекул, которые напрямую или опосредованно связываются с окклюдином (рис. 5). Белки ZO-1 и ZO-2 оказались первыми открытыми компонентами плотных контактов, которые колокализуются с окклюдином (Furuse et al., 1994). В 1998 году Haskins и соавторами был открыт белок ZO-3, который показывал высокую аффинность к окклюдину и ZO-1, что также позволило предположить о его связи с окклюдином (Haskins et al., 1998). Кроме того были получены данные о взаимодействии окклюдина с JAM (Bazzoni et al., 2000), JEAP (Nishimura et al., 2002) CLMP (Raschperger et al., 2004) и другими молекулами. Все это свидетельствует о сложности и многообразии белковых комплексов, которые формируются окклюдином.

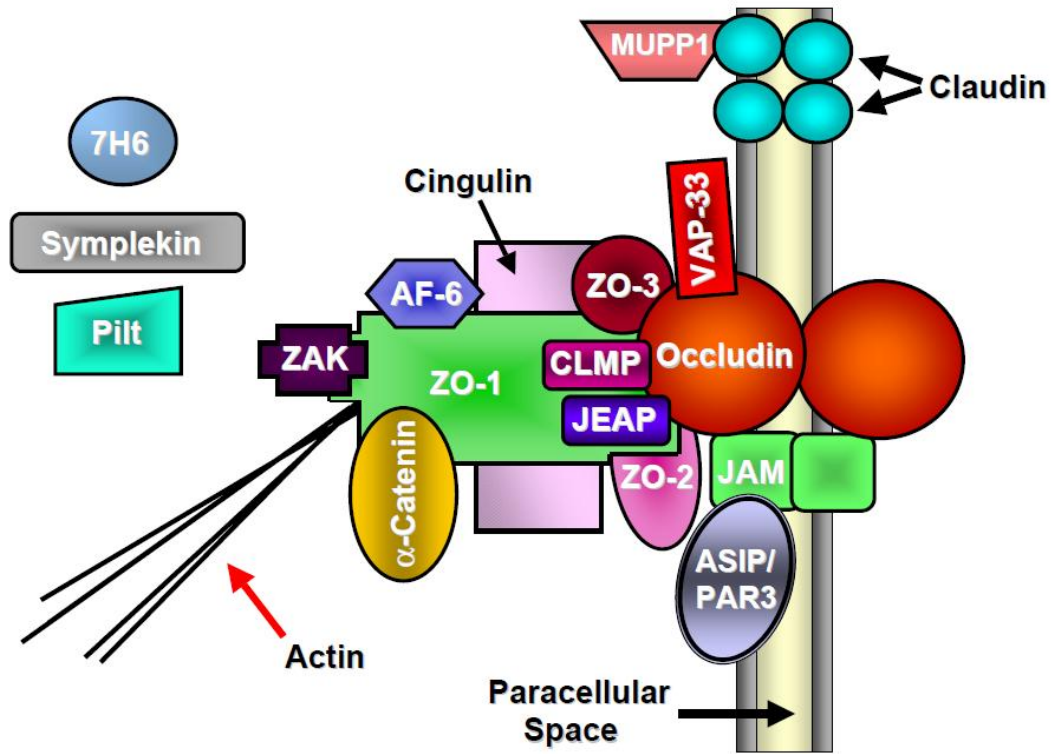


Рис. 5. Взаимодействие окклюдина с другими белками плотных контактов (Feldman et al., 2005)



Многочисленные данные свидетельствуют о том, что регуляция функций окклюдина связана с его фосфорилированием по остаткам серина/треонина. В клетках линии MDCK I Sakakibara et al. в 1997 впервые показали наличие высоко фосфорилированного окклюдина. Было высказано предположение о том, что распределение и функционирование окклюдина может контролироваться с помощью фосфорилирования. Они сравнили экспрессию окклюдина в плотных MDCK I и проницаемых MDCK II и увидели различие в молекулярной массе окклюдина в этих клеточных линиях. Окклюдин в MDCK I клетках был обнаружен преимущественно в гиперфосфорилированной форме и давал специфический банд при электрофорезе в области 72-75 кДа, в то время как в MDCK II клетках окклюдин был менее фосфорилирован (70-73 кДа). Эти данные свидетельствовали о том, что фосфорилирование окклюдина может увеличивать барьерные свойства плотных контактов (Wong et al., 1997). В дальнейшем было также показано фосфорилирование окклюдина по остаткам треонина. Одной из предполагаемых функций такого фосфорилирования является значительное повышение сродства окклюдина к цитоплазматическим белкам ZO-1 ZO-2 ZO-3. (Kale et al., 2003). Процесс фосфорилирования окклюдина остается во многом неизвестным, однако есть данные о том, что в него вовлечены киназы c-Src, PKC $\zeta$ , and PKC $\lambda/1$  и другие (Rao, 2009).

**Адгезионные белки (JAMs).** Это еще один тип трансмембранных белков плотных контактов. Они принадлежат к иммуноглобулиновому суперсемейству и пронизывают плазматическую мембрану один раз. Известно, что JAM участвуют в парацеллюлярном транспорте клеток крови. Так, например, эти молекулы позволяют лейкоцитам достичь воспаленных участков, которые ответ на хемоаттрактанты мигрируют из крови через эндотелий и достигают воспаленного участка по межклеточному пути. Это проверено так же и *in vivo* на модели кожной воспалительной реакции

(Martin-Padura et al., 1998). Исследования белков семейства JAM показали, что они также играют важную роль в осуществлении барьерной функции и препятствуют диссоциации белкового комплекса плотных контактов (Matter et al., 2005). Молекула CAR также принадлежит семейству JAM и выполняет рецепторную функцию в подоцитах почки (Nagai et al., 2003).

**Трицеллюлин.** Трицеллюлин был открыт в 2005 году Ikenouchi et al. (Ikenouchi et al., 2005). Данные исследователи вводили в мышинные клетки Eph4 вектор, содержащий транскрипционный фактор Snail, который полностью подавляет развитие плотных контактов и участвует в эпителиально-мезенхимальном преобразовании клеток. При скрининге библиотеки транскриптов, которые не присутствовали в клетках Eph4-Snail по сравнению с контрольными клетками, был найден белок, показывающий большое сходство в топологии с известными к тому времени клаудинами и окклюдинами (рис. 6). Этот белок был назван трицеллюлином, содержал 555 аминокислот, имел молекулярную массу 63,6 кДа. Как и в случае с окклюдином, у трицеллюлина N- и C- концы были помещены в цитоплазму, а две экстраклеточные петли находились снаружи клетки. С помощью метода конфокальной лазерной микроскопии и иммуномечения моноклональными антителами было выяснено преимущественное расположение трицеллюлина в плотных контактах между 3-мя клетками, отсюда и пошло его название (tricellular=3-х клеточный). Последующие исследования этой же группы авторов на клетках показали, что окклюдин влияет на такую специфическую локализацию трицеллюлина. При нокауте гена окклюдина в клетках MDCK II трицеллюлин распределялся по всей области плотных контактов (Ikenouchi et al., 2008). Трицеллюлин показывает экспрессию в семенниках, кишке, почках, легких, мозге и печени (Ikenouchi et al., 2005).

О функциях трицеллюлина известно немного. Было показано, что в линии клеток MDCK II сверхэкспрессия трицеллюлина приводила к его появлению во всех областях плотных контактов, увеличивала

трансэпителиальное сопротивление и уменьшала проницаемость клеточного пласта для ионов и макромолекул (Krug et al., 2009). В трицеллюлярной области плотных контактов было показано значительное снижение трицеллюлином потока макромолекул, но не ионов. Этот феномен авторы объяснили свойствами трицеллюлярного плотного контакта и расположенной здесь так называемой центральной трубочки (рис. 4), которая является ограниченно проницаемой для макромолекул, но слишком широкой в диаметре, чтобы каким-либо образом препятствовать потоку ионов.

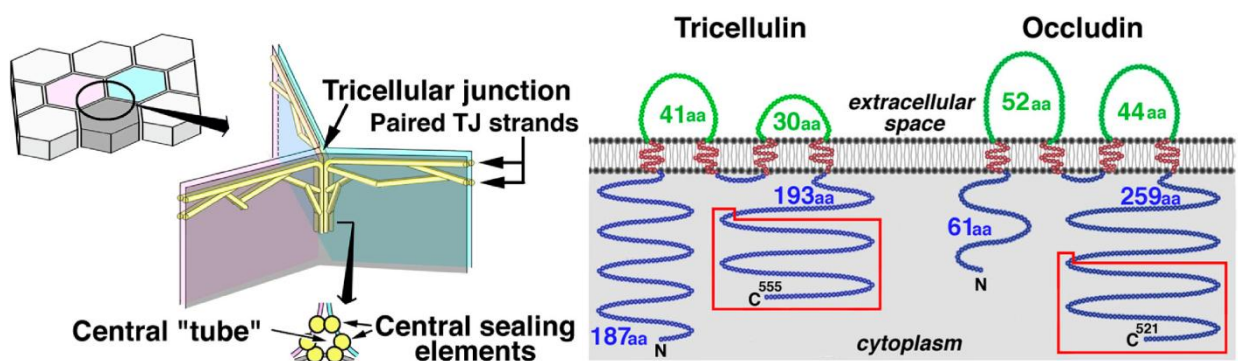


Рис. 6. Структура и локализация трицеллюлина (Ikenouchi et al., 2005)

В настоящее время выявлено участие трицеллюлина в формировании трехклеточных плотных контактов в эпителии улитки внутреннего уха и вестибулярного аппарата. При наличии рецессивной мутации гена трицеллюлина развивается глухота (Riazuddin et al., 2006).

**Цитоплазматические белки плотных контактов.** Часть цитоплазмы клетки, расположенная под плотными контактами содержит несколько сложных белковых комплексов, которые вовлечены во взаимодействия трансмембранных белков, регуляцию цитоскелета, обеспечение поляризации клеток, а также внутриклеточного сигналинга.

Цитоплазматические белки плотных контактов можно условно разделить на две группы. К первой группе относят белки, которые являются структурной основой цитоплазматического компонента плотных контактов и

содержат в своем составе PDZ-домены. PDZ-домен – это консервативная последовательность 80-90 остатков аминокислот, которая служит для взаимодействия внутриклеточных белков с другими белками, содержащими PDZ-домены, заякоривания трансмембранных белков плотных контактов за компоненты цитоскелета, а также участия в некоторых сигнальных механизмах. Существует также гетерогенная группа цитоплазматических белков плотных контактов, в которых отсутствуют PDZ-домены. Эти белки преимущественно участвуют в регуляции белков плотных контактов и осуществляют сигнальные функции (Guillemot et al., 2008).

Белки, содержащие PDZ-домены включают в себя представителей семейств ZO-(ZO-1, ZO-2, ZO-3), MAGI (MAGI-1, MAGI-3), белки MUPP1, AF-6/afadin и другие. Структура этих белков, а также некоторые их связи схематично представлены на рис. 7.

ZO-1 (220 кДа) – был первым открытым белком плотных контактов. В 1986 году Stevenson et al. использовали специфическую белковую фракцию печени мыши и получили антитела к белку ZO-1, который показывал значительное сродство к плотным контактам (Stevenson et al., 1986). В дальнейшем с помощью методики иммунопреципитации были идентифицированы белки ZO-2 и ZO-3, ассоциированные с ZO-1. Многочисленные работы свидетельствуют о том, что ZO-белки находятся в центре белковых взаимодействий в плотных контактах и являются их необходимым компонентом (Guillemot et al., 2008). Показано, что их первый PDZ-домен напрямую связывается с клаудинами (Itoh et al., 1999). Клетки ЕрН4, в которых подавляли экспрессию ZO-1, ZO-2 белков были неспособны сформировать плотные контакты (Umeda et al., 2006). В клетках MDCK, напротив, показано значительное замедление формирования плотных контактов при подавлении экспрессии ZO-1, но несмотря на это, сформированные плотные контакты нормально функционировали (McNeil et al., 2006; Van Itallie et al., 2009). Однако, полученные результаты этих авторов свидетельствуют о том, что ZO-2 не является необходимым для

формирования плотных контактов в линии клеток MDCK. Группа исследователей из Мексики получила противоположные данные при подавлении экспрессии белка ZO-2 в клетках MDCK с помощью РНК-интерференции (Hernandez et al., 2007). В частности, клетки показывали существенное снижение (20%) трансэпителиального сопротивления по сравнению с контролем, увеличение парацеллюлярного транспорта, а также значительные изменения в клеточном строении и поляризации монослоя. Из всех этих данных можно заключить, что белки семейства ZO являются важнейшим структурным и функциональным компонентом плотных контактов и принимают непосредственное участие в их формировании.

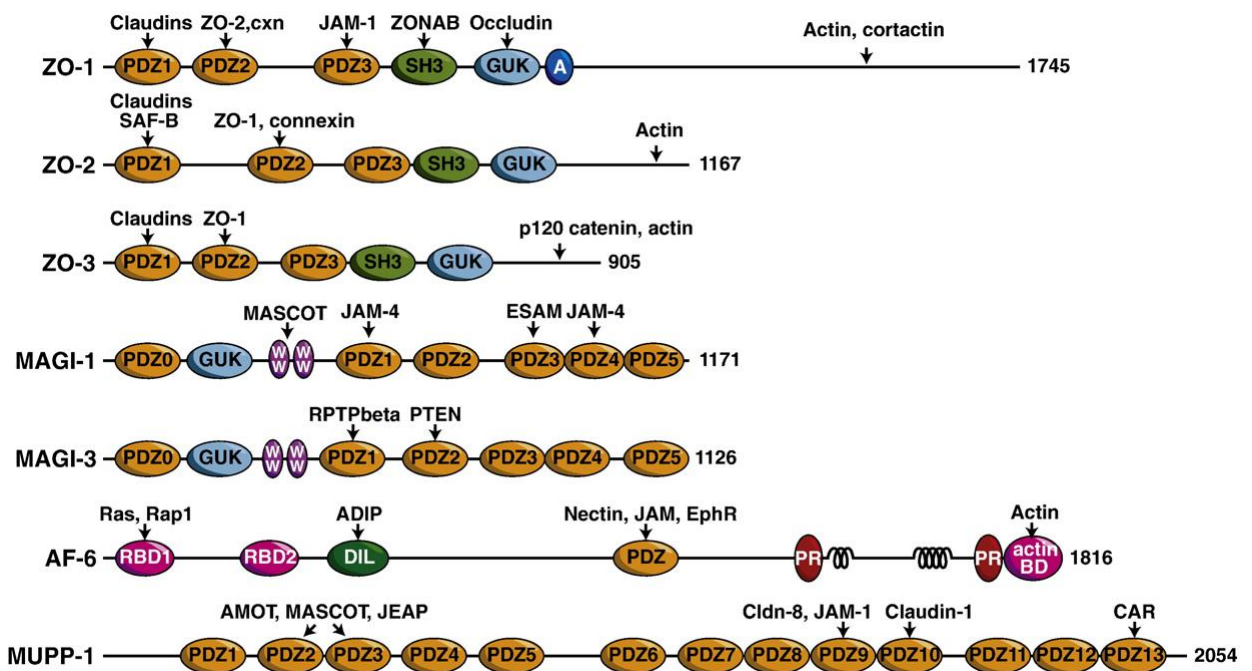


Рис.7 Структура цитоплазматических белков плотных контактов (Guillemot et al., 2008)

Семейство MAGI-белков вовлечено во взаимодействие с интегральными мембранными белками (в том числе с молекулами адгезии JAM и ESAM), а также со всевозможными сигнальными K-Ras, Rho-, Ras-белками (Laura et al., 2002). Их роль активно изучается в настоящее время (Guillemot et al., 2008).

AF-6/afadin осуществляет регуляцию активности малой ГТФазы Rap-1 и взаимодействует с Ras (Guillemot et al., 2008). Показано, что присутствие AF-6/afadin крайне важно для развития поляризации в эпителиальных тканях. Делеция по гену AF-6/afadin приводила к дезорганизации эктодермы и мезодермы и к гибели зародышей мыши на ранних стадиях эмбриогенеза (Zhadanov et al., 1999).

Белок MUPP1 был открыт в 1998 году с использованием двухгибридной системы дрожжей, однако его вклад в работу плотных контактов до сих пор неизвестен (Ulmer et al., 1998).

Группа белков, не содержащих PDZ-домены в своем составе включает в себя цингулин, симплекин, JACOP/Paracingulin, Angiomotin, а также различные сигнальные молекулы – киназы (ZAK, WNK4 и др.), фосфатазы (PP2A и др.), регуляторы мембранного транспорта (Rab13), регуляторы активности малых ГТФаз (GEF, GAP и др.), транскрипционные факторы (DbpA и др.). Детальное описание каждого из этих белков выходит за рамки данного обзора. Следует отметить, что они выполняют в основном сигнальные и регуляторные функции (Guillemot et al., 2008). Часть из них вовлечена в регуляцию экспрессии генов.

Таким образом, можно сделать вывод о том, что внутриклеточный компонент плотных контактов осуществляет двустороннюю связь между интегральными белками и филаментами цитоскелета, а также в трансдукции сигналов к другим белкам клетки.

**Белки семейства клаудина.** Клаудины представляют собой белки плотных контактов, которые обеспечивают парацеллюлярный барьер или формируют селективные ионные поры. Они были открыты в 1998 году (Furuse et al., 1998). Сейчас насчитывается 27 белков данного семейства (Mineta et al., 2011). Молекулярная масса клаудинов составляет 17-27 кДа (рис.8).

Эти белки четыре раза пронизывают мембрану. N-и C-концы находятся в цитоплазме (рис.10). Некоторые клаудины имеют PDZ домен в C- концевом участке, и с помощью него связываются с субмембранными белками ZO-1, ZO-2, ZO-3. Остальные представители клаудинов из-за отсутствия PDZ домена такой способностью не обладают (Itoh et al., 1999). Их внеклеточные петли выступают на латеральной поверхности клетки и взаимодействуют с такими же петлями соседней клетки. Взаимодействуя подобным образом, белки играют роль в регуляции проницаемости по парацеллюлярному пути.

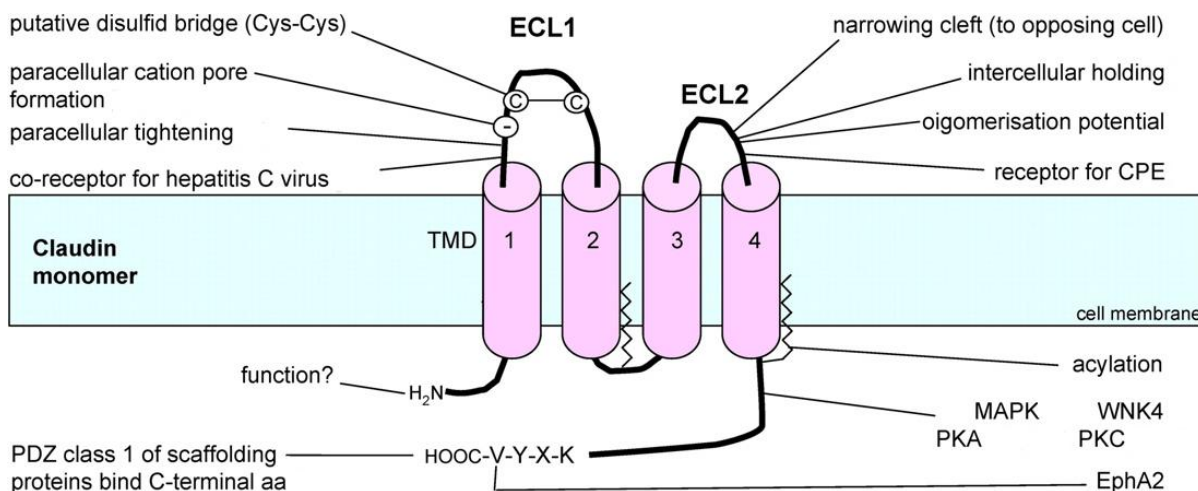


Рис.8. Строение клаудинов

Для белков семейства клаудина характерно 2 типа связей: гомофильный и гетерофильный. Гомофильный происходит между клаудинами одного типа (клаудин-4-клаудин-4), а гетерофильный между клаудинами разного типа (клаудин-3-клаудин-4). Наиболее часто в паре клаудинов, формирующих гетерофильное взаимодействие встречается клаудин-3. Для этих двух типов связей (гетерофильной и гомофильной) характерны также и цис/транс взаимодействия (Krause et al., 2008). Данные типы взаимодействий между клаудинами лежат в основе осуществления барьерной функции плотных контактов (рис.9)

Известно, что в плотном контакте экспрессируется сразу несколько типов клаудинов. В недавних работах показано, что белки этого семейства располагаются в плотном контакте неслучайным образом (Nunes et al., 2006). Во внутреннем ухе разные клаудины обособляются в морфологически и пространственно различимые субдомены.

Белки семейства клаудина по вкладу в проницаемость эпителия разделяются на 2 группы. К первой относятся клаудины, формирующие селективные ионные поры. Ко второй группе те, которые усиливают плотность эпителия.

Первая группа представлена клаудинами-2,-7,-12,-13,-15,-16. Эти белки осуществляют селективную межклеточную диффузию положительно заряженных ионов (Simon et al., 1999; Weber et al., 2001). Так, например клаудины-2 и -7 мыши и человека имеют по три отрицательные аминокислоты в первой внеклеточной петле (Van Itallie et al., 2003; Alexandre et al., 2005), что позволяет им участвовать в транспорте катионов. Клаудин-2,-12 усиливают межклеточную диффузию ионов  $Ca^{+2}$  в эпителии кишки (Chiba et al., 2008). Известно, что клаудин-16 локализован в плотных контактах толстой восходящей части петли Генле и необходим для межклеточной реабсорбции ионов  $Mg^{2+}$  и  $Ca^{2+}$ . Нарушение его экспрессии ведет к появлению рецессивного аутосомного заболевания – гипомагниемии, сопровождающейся гиперкальциурией и нефрокальцинозом (Simon et al.,



1999; Weber et al., 2001). Ко второй группе относятся клаудины-1,-3,-4,-5,-8,-14,-18,-19 (Krause et al., 2008). Они не формируют поры для катионов и анионов, снижая проницаемость эпителия. Как следствие, проницаемость эпителия будет зависеть от того, экспрессия каких именно клаудинов представлена в большей степени.

Кроме того, клаудины подразделяют на классические и неклассические на основании последовательности аминокислот в первой внеклеточной петле. Для каждого клаудина характерны определенное количество и расположение заряженных аминокислот (Furuse et al., 2006; Van Itallie et al., 2006). В соответствии с последовательностью аминокислот клаудины можно разделить на две группы: классические и неклассические (Krause et al., 2008). К первым относятся клаудины-1,-2,-3,-4,-5,-6,-7,-8,-9,-10,-14,-15,-17,-19. Ко второй группе относятся клаудины-11,-12,-13,-16,-18,-20,-21,-22,-23,-24 (рис.11.).

Также показано, что разные типы клаудинов имеет некую специфичность к размерам молекул, которые проходят через плотный контакт. Так, у мышей, нокаутных по клаудину-5, в эндотелии сосудов мозга формировались плотные контакты, основанные на клаудине-12. У этих мышей через гематоэнцефалический барьер могли проникать только малые молекулы (< 800 Да), а большие молекулы не могли его преодолеть. (Nitta et al., 2003; Chiba et al., 2008).

Существует много заболеваний, связанных с нарушением барьерных свойств эпителия при дисфункции белков плотных контактов. К примеру болезнь Крона, при которой у пациентов наблюдается увеличение интестинальной проницаемости (Katz et al., 1989; Peeters et al., 1997).

Таким образом, становится ясным, что основная роль клаудинов заключается в регулировании проницаемости и обеспечении селективной проницаемости ионов по парацеллюлярному пути. Однако, белки данного семейства выполняют и некоторые иные функции.

Известна роль клаудинов, как рецепторов для вирусов и энтеротоксинов. Предполагают, что некоторые клаудины, такие как клаудины-1,-3,-4,-6 и -7 обладают рецепторной функцией. Клаудин-1 имеет сайт связывания с вирусом гепатита С, а клаудины,-3,-4,-6 и -7, взаимодействуя с энтеротоксином *Clostridium perfringens* (Katahira et al., 1997; Berkes et al., 2003).

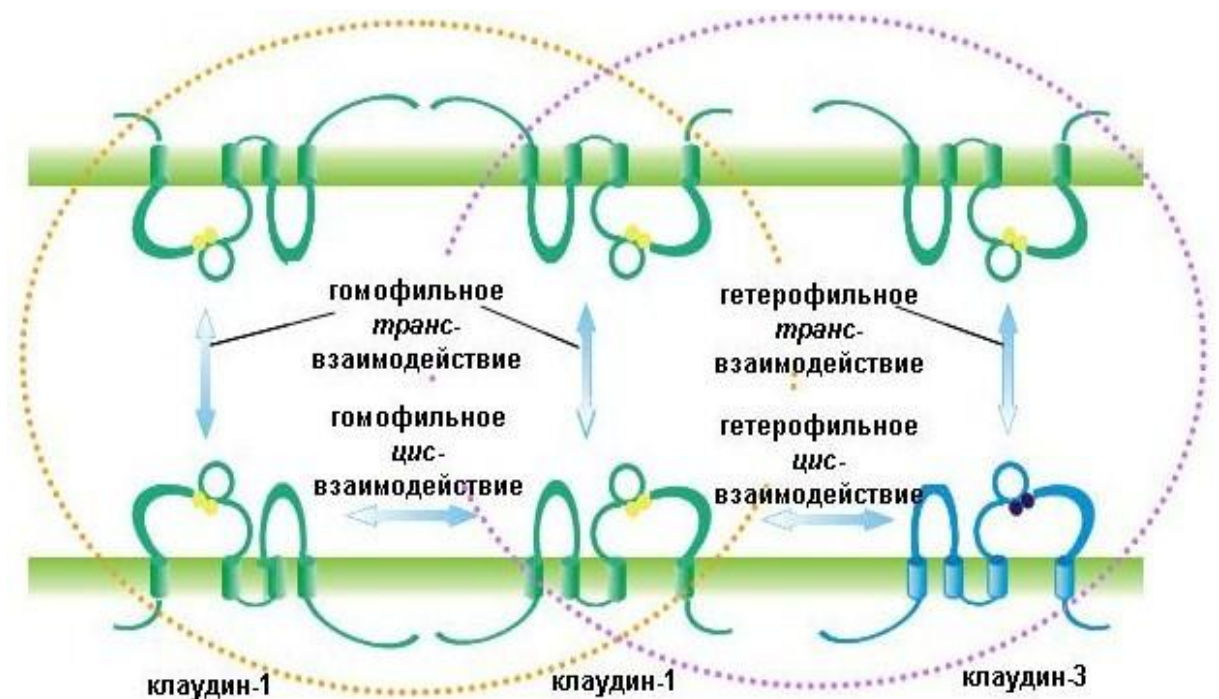


Рис. 9. Схема возможных типов взаимодействия между клаудинами двух соседних эпителиальных клеток.

Зеленым цветом обозначен клаудин-1, синим – клаудин-3. [Krause et al., 2008].

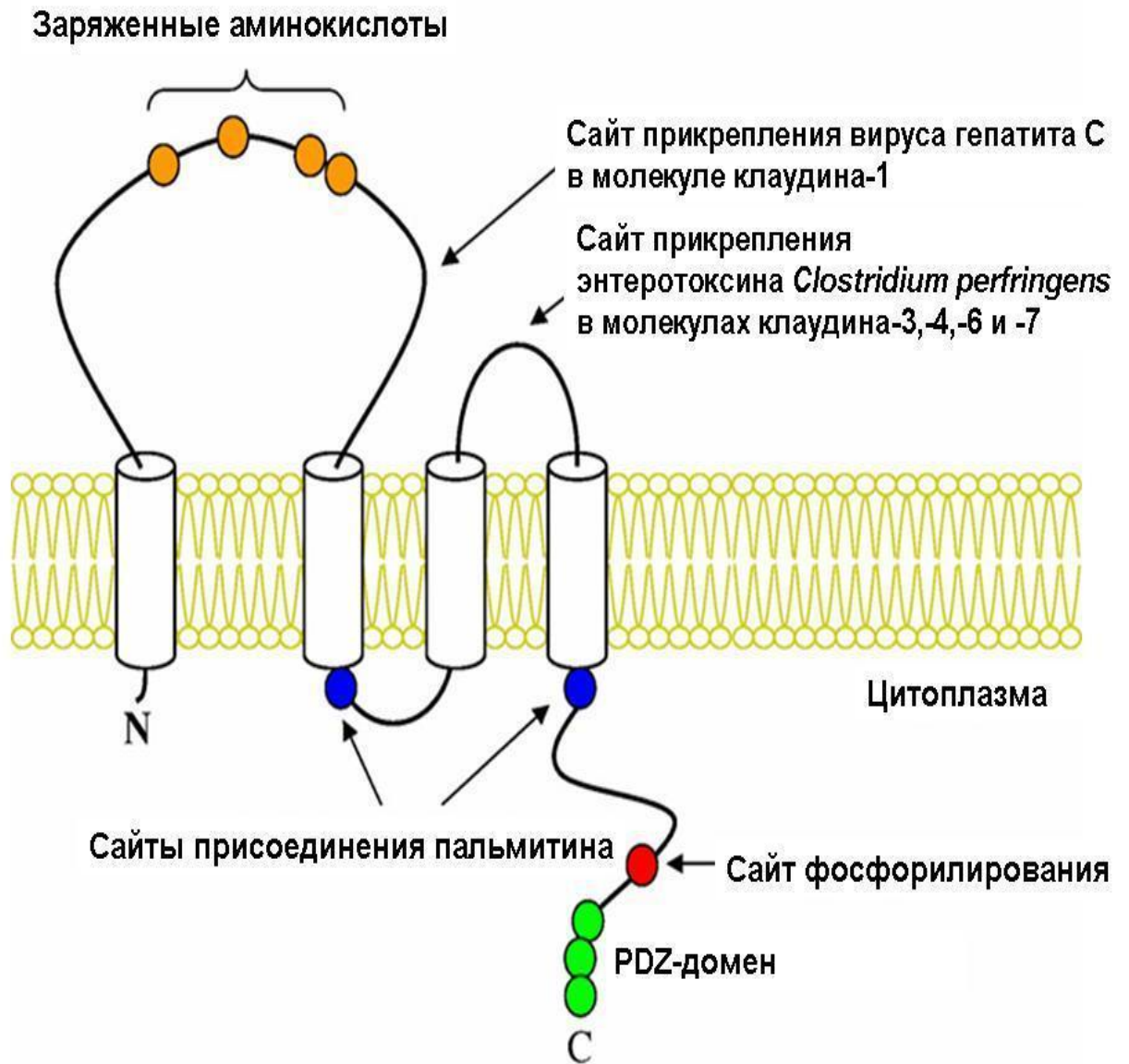


Рис.10. Структура клаудина. [Chiba et al.,2008]

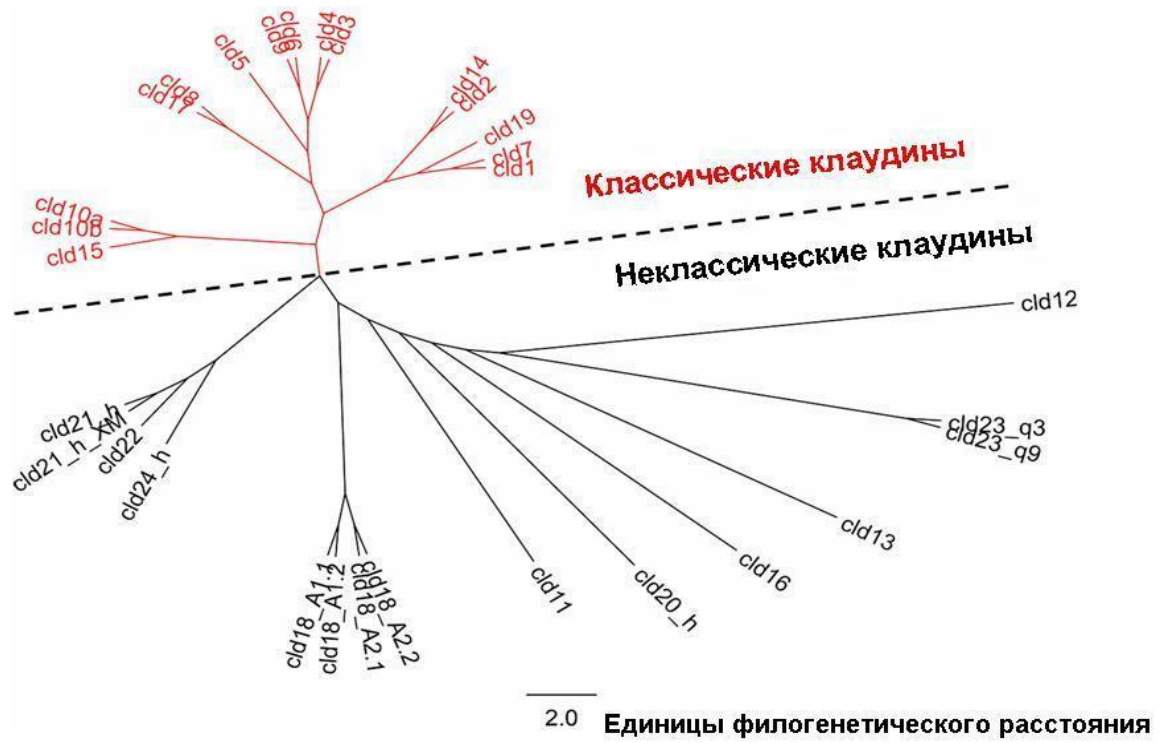


Рис.11. Филогенетическое древо клаудинов. Классические клаудины 1–10, 14, 15, 17, и 19 с высокой степенью родства, обозначены красным. Неклассические клаудины 11–13, 16, 18 и 20–24 показаны черным (Krause et al., 2008).

#### 1.4. Клеточные культуры и линии, как модели для изучения эпителия

Культивирование клеток представляет собой сложный процесс, посредством которого *in vitro* отдельные клетки (или единственная клетка) прокариот и эукариот искусственно выращиваются в контролируемых условиях. Первые попытки культивирования клеток животных вне организма относятся к концу прошлого столетия (Roux, 1895). Отрывочные наблюдения того времени указывали на возможность сохранения жизнеспособности тканей и клеток в искусственных условиях и положили начало глубоким научным исследованиям тканевых и клеточных культур.

Впоследствии в зависимости от вида ткани, из которой происходит первичная эксплантация клеток и техники ее культивирования стали различать несколько видов переживающих и растущих культур клеток – эпителиальные, нервные, мышечные и другие. Наибольшее распространение получили однослойные и суспензионные культуры растущих клеток.

Следует отметить, что термин “клеточная культура” не всегда является синонимом термина “клеточная линия”. В частности, первичная культура клеток, полученная из организма животного, имеет ограниченный срок жизни. Лишь отдельные клетки или группы клеток популяции на фоне дегенерации большей части клеточного пласта могут сохранить способность к росту и размножению. Эти клетки, обнаружив потенцию бесконечного размножения *in vitro*, при многократном пассажировании дают начало перевиваемым культурам клеток, или клеточным линиям (Адамс, 2001).

В настоящее время детальное изучение физиологии эпителиальных тканей не может обойтись без использования метода клеточных культур. Эпителиальные клеточные культуры приобрели чрезвычайно широкое распространение в исследованиях по современной биологии, медицине, фармакологии (Handler et al., 1980; Kreisberg et al., 1988; Gstraunthaler et al., 1990). Из эпителиальных тканей животных были получены многочисленные постоянные клеточные линии: почечные - LLC-PK1, M-1, MDCK; кишечные

- Сасо-2, НТ-29; легочные - BEAS-2B, А-549 и др. Такая широкая популярность и востребованность данного метода среди физиологов и клеточных биологов объясняется его очевидными преимуществами, главным из которых является то, что клеточные популяции в составе эпителиальной клеточной культуры образованы одним типом клеток; их рост поддерживается в постоянных и строго контролируемых условиях.

Набор клеток в составе эпителиальной ткани практически всегда гетерогенен, что значительно усложняет процесс интерпретации полученных результатов. Более того, можно изменять условия культивирования клеточных линий в определенных пределах, что позволяет оценивать на рост клеток самых различных внешних воздействий– физиологически активных веществ, рН, температуры и т.д. Физиологические действия данных факторов могут быть оценены в течение очень короткого времени и с высокой степенью достоверности, поскольку здесь исключается нервное, эндокринное и другие воздействия, как это имеет место при исследовании на целом органе или эпителиальной ткани.

Возможность прижизненного наблюдения за клеточными культурами с помощью микроскопа – еще одно из очевидных достоинств данной методики. Прижизненное наблюдение за эпителиальными тканями животного может быть сильно затруднено или часто вообще отсутствует. Все эти реальные преимущества по сравнению с исследованиями на целых животных ставят клеточные культуры как ценную экспериментальную систему для выяснения физиологических механизмов функционирования эпителиальных тканей.

Таким образом, хотя клеточные культуры не способны полностью воспроизвести всю сложность структурных и функциональных взаимодействий клеток разных типов в составе ткани и органа, их использование при анализе процессов трансэпителиального транспорта является важнейшим экспериментальным подходом в современной физиологии.

**Клетки линии IPES-J2.** Культура клеток IPES-J2 представляет собой поляризованные эпителиальные клетки тощей кишки новорожденного поросенка, которые впервые были получены в 1989 году в университете Северной Каролины Хеленой Берншнайдер (Berschneider, 1989).

Эта клеточная культура обладает высоким трансэпителиальным сопротивлением ( $>1$  kОм). IPES-J2 уникальны тем, что получены прямо из тощей кишки по сравнению с клетками Caco-2, которые являются клетками аденокарциномы ободочной кишки человека.

Данная клеточная линия является интересным объектом для исследования проницаемости, так как в них показаны белки различные клаудины. Клетки IPES-J2 обычно используются как модель взаимодействия эпителиальных клеток с различными бактериями и вирусами. В последнее время появилось большое количество работ в этом направлении (Schierack et al., 2006, Sonntag et al., 2005). Однако действие холерного токсина на проницаемость данной клеточной линии не исследовано. Влияние липополисахарида на линию IPES-J2, полученного из *E. coli*, также практически не изучено.

В настоящее время показана экспрессия генов иммунных молекул в IPES-J2 клетках. В некоторых работах также показана экспрессия TLR-подобных рецепторов (рис.12.)

Считается, что данные, полученные на клеточной линии из кишечника поросенка, можно более адекватно экстраполировать на человека по сравнению с моделями, полученными из грызунов (IES-6 или IES-18 линии).

Таким образом, работы на IPES-J2 клетках могут предоставить ценную информацию о взаимодействии слизистой оболочки кишечника человека с различными микроорганизмами.

**Table 2**  
Immune molecule expression in IPEC-J2 cells.

Molecule	mRNA	Protein
CCL2	-	ND
CD16b (FCGR3B)	+	ND
CD47	+	ND
CD58	+	ND
GM-CSF (granulocyte macrophage colony stimulating factor)	+	ND
ICAM1 (intracellular adhesion molecule)	+	ND
IFN- $\gamma$	-	ND
IL-1 $\alpha$	+	ND
IL-1 $\beta$	+/-	ND
IL-2	-	ND
IL-4	-	ND
IL-6	+	+
IL-7	+	ND
IL-8	+	+
IL-10	-	ND
IL-12A (p35)	+/-	ND
IL-12B (p40)	+	ND
IL-15	-	ND
IL-18	+	ND
IRG6 (inflammatory response protein 6, antiviral)	+	ND
MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1)	+/-	ND
MHC I (major histocompatibility complex I)	ND	+
MHC II (major histocompatibility complex II)	ND	-
MIF (macrophage migration inhibitory factor)	+	ND
MIP-3 $\alpha$ (CCL20)	+	ND
MyD88 (myeloid differentiation primary response gene 88)	+	ND
NF $\kappa$ B1 (nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B cells 1)	+	ND
NOD1 (nucleotide-binding oligomerization domain containing 1)	+	ND
pBD-1 (porcine beta defensin 1)	+	ND
pBD-2 (porcine beta defensin 2)	+	ND
pPGRP-L1 (peptidoglycan recognition protein-long 1)	+/-	+
pPGRP-L2 (peptidoglycan recognition protein-long 2)	+	+
TGF- $\beta$ 1	+/-	ND
TGF- $\beta$ 3	+	ND
TNF- $\alpha$	+	ND
TNF- $\beta$	-	ND

+, present; -, absent; +/-, detected in some studies, but not in others; ND, not determined.

**Table 3**  
Toll-like receptor expression in IPEC-J2 cells.

Molecule	mRNA	Protein
TLR1	+	
TLR2	+	+
TLR3	+	+
TLR4	+	ND
TLR5	+/-	+
TLR6	+	ND
TLR8	+	ND
TLR9	+	+
TLR10	+	ND

+, present; -, absent; +/-, detected in some studies, but not in othe

*Рис.12 Иммуные молекулы и Toll-like рецепторы в IPEC-J2*



### **1.5. Микробиота желудочно-кишечного тракта и вещества, изменяющие проницаемость эпителия**

**Микробиота тощей кишки.** Вся нормальная микробиота делится на постоянную, факультативную и транзиторную. Постоянная составляет около 90% микроорганизмов, факультативная менее 9,5% и случайная примерно 0,5%. Процентное соотношение представительства микроорганизмов в различных органах сильно варьирует. Известно, что примерно 20% микроорганизмов обитает в полости рта, 18-20% приходится на кожные покровы, 15-16% — на глотку. Однако, наибольшее количество микроорганизмов находится в желудочно-кишечном тракте (40%).

В желудочно-кишечном тракте представительство микробиоты классифицируют по его различным отделам. Кроме того, различают пристеночную микрофлору и просветную. В основном микробиота в слизистой тонкой и толстой кишки представлена 15-20 ассоциациями доминирующих анаэробных, факультативно анаэробных и аэробных бактерий. Основные представители относятся к родам *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Escherichia*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Staphylococcus* (Бондаренко, 2007).

Нормальное функционирование кишечной микробиоты зависит от ряда факторов, таких как состояние иммунной, гормональной, пищеварительной систем организма.

При нормальном функционировании микробиоты поддерживается кишечный барьер. Показано, что пробиотики нормализуют его функционирование у мышей с колитом (Madsen et al., 2001). Кроме того, пробиотики предотвращают нарушения целостности эпителиального барьера, которое вызывается патогенами. Следует отметить, что после применения антибиотиков пробиотики способны восстанавливать пищеварительную функцию (Ермоленко и др., 2009).

Активность бактерий нормальной микрофлоры в борьбе с патогенами представляет собой современный объект исследований баланса между нормальной микробиотой и условно патогенной. В настоящее время активный интерес исследований в области микробиологии привлекает изучение бактериальных биопленок и факторов, влияющих на их формирование (Афиногенова, 2008). Сегодня активно изучается действие антимикробных препаратов, предотвращающих эффекты воздействия патогенных микроорганизмов (Громова, 2012).

Нормальная микробиота кишечника обеспечивает неспецифическую защиту организма, которая осуществляется посредством активации макрофагов, стимуляции лимфоидной ткани, воздействия на иммунокомпетентные клетки. Иммуноглобулины вырабатываются и вовлекаются в контроль над микроорганизмами. Они блокируют прикрепление патогенных организмов к эпителию слизистой оболочки. Таким образом, представители нормальной микробиоты осуществляют ряд важнейших функций в организме:

- являются барьером для проникновения микробов и токсинов во внутреннюю среду организма
- синтезируют образование биологически активных веществ
- принимают участие в утилизации пищевых субстратов и ксенобиотиков
- синтезируют аминокислоты, белки, витамины
- регулируют гуморальный и клеточный иммунитет

**Липополисахарид.** Лидирующим фактором патогенности грамотрицательных условно патогенных бактерий является эндотоксин – липополисахарид. Повышение концентрации липополисахарида при разрушении клеточной стенки грамотрицательных бактерий вызывает развитие воспалительного процесса с последующим формированием очага воспаления.

Известно, что липополисахарид является основным компонентом клеточной стенки грамотрицательных бактерий. Липополисахарид поддерживает структурную целостность бактериальной клетки, защищая мембрану от агрессивных воздействий окружающей среды. Благодаря отрицательному заряду липополисахарида увеличивается общий отрицательный заряд бактерии и стабилизируется мембрана бактерии.

Известно, что липополисахарид мозаично располагается на наружной мембране клеточной стенки в комплексе с белками и полисахаридами. Высвобождение липополисахарида осуществляется в результате самообновления клеточного пула, при гибели бактериальных клеток. Липополисахарид является термостабильным гетерополимером. В его структуру входят: липид А, который ассоциирован с кетодеооксиоктканатом, core-регион и боковые полисахаридные О-цепи (рис.13). Полисахаридная часть липополисахарида отличается значительной вариабельностью у различных штаммов грамотрицательных бактерий и определяет гидрофильность молекулы липополисахарида. Самой консервативной частью молекулы липополисахарида, отвечающей за биологические свойства молекулы, является липид А. В состав липида А входят жирные кислоты, глюкозамин и остатки фосфорной кислоты. Гидрофобные свойства молекула приобретает за счет жирных кислот. Особенность химической структуры липополисахарида обуславливает способность к взаимодействию, как с растворимыми компонентами биологических жидкостей, так и с рецепторным аппаратом клеточных мембран. О-цепи соединены с липидом А через сердцевинный полисахарид (core-регион), структура которого условно разделяется на внешнюю и внутреннюю части. Грамотрицательные бактерии, которые не способны синтезировать кетодеооксиоктканат, утрачивают жизнеспособность. Следует отметить, что степень выраженности биологических эффектов липополисахарида зависит от ряда факторов. К основным можно отнести молекулярную массу липополисахарида и пространственную структуру (Wei et. al., 2013).

Именно липид А в структуре липополисахарида обеспечивает его биологическую активность. Введение эндотоксина липополисахарида приводит к следующим эффектам:

- активации лейкоцитов и макрофагов, клеток эндотелия и гладких мышц
- стимуляции продукции интерферона, провоспалительных цитокинов
- активации синтеза белков острой фазы
- поликлональной активации В-клеток
- подавлению тканевого дыхания
- активации системы комплемента
- активации тромбоцитов и факторов свертывания крови
- эндотоксическому шоку
- острой полиорганной недостаточности.

Эти эффекты обусловлены взаимодействием липополисахарида с рецептором TLR4, который распознает эндотоксин в кооперации с внеклеточными белками MD2, CD14 и LBP (LPS binding protein).

Эффекты действия эндотоксина зависят, прежде всего, от его концентрации. Активация клеток и систем при низких дозах эндотоксина липополисахарида с увеличением его концентрации переходит в гиперактивацию, которая может приводить в конечном итоге к эндотоксическому шоку и острой полиорганной недостаточности. Это может происходить при генерализованных инфекциях, вызванных грамотрицательными бактериями. В кровотоке липополисахарид находится в агрегированном состоянии. Это ведет к слабому взаимодействию с лейкоцитами и отсутствию выраженного клеточного ответа (Feng et. al., 2010). Ослабление биологических эффектов липополисахарида, а также элиминация и детоксикация осуществляются посредством белков острой фазы: С-реактивного белка, трансферрина, преальбумина. Они значительно усиливают ответ организма на липополисахарид (Kim et.al., 2004).

Установлено, что в ответ на появление высвободившегося из бактериальных клеточных стенок липополисахарида в организме

запускаются эволюционно сформированные неадаптивные и адаптивные механизмы антиэндотоксиновой защиты, направленные на распознавание, связывание и элиминацию липополисахарида. Эти процессы начинаются с образования комплексов липополисахарида с липополисахарид-связывающим белком (LBP), с белком, повышающим проницаемость мембран (BPI), рецепторами CD14. В дальнейшем комплекс LPS-LBP-CD14 взаимодействует с Toll-подобными рецепторами 4 типа (TLR4), что приводит к активации транскрипционного ядерного фактора NF- $\kappa$ B и экспрессии генов цитокинов, ферментов и других регуляторных молекул, а впоследствии — к синтезу специфических антител к core-региону липополисахарида (Fink M.P., Mythen M.G., 1999; Рябиченко Е.В и др., 2004; Бондаренко В.М., 2010) (рис.14).

Таким образом, распознавание липополисахарида рецепторами TLR4, связывание с CD14, LBP, BPI, липопротеинами и далее активация транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B являются ведущими начальными звеньями нейтрализации эффектов липополисахарида (рис.9). Это нужно для формирования специфического иммунного ответа, включающего синтез IL-12, IL-23, IL-27, дифференцировки Т-хелперов I типа и В-лимфоцитов, распознающих и связывающих белковые, полисахаридные и липопротеидные антигены.

В норме избыточное проникновение липополисахарида в системный кровоток ограничено неадаптивным и адаптивным звеньями иммунной системы. Однако, сверхнагрузка липополисахарида приводит к срыву и истощению антиэндотоксинового иммунного ответа и полной реализации всех негативных биологических эффектов липополисахарида в результате прямого деструктивного воздействия на клеточные мембраны и опосредованного — через инициацию медиаторного каскада, что может привести к дисфункции практически всех органов и систем макроорганизма (Бондаренко В.М., Рябиченко Е.В., 2010; Бондаренко В.М., Лиходед В.Г., 2012).

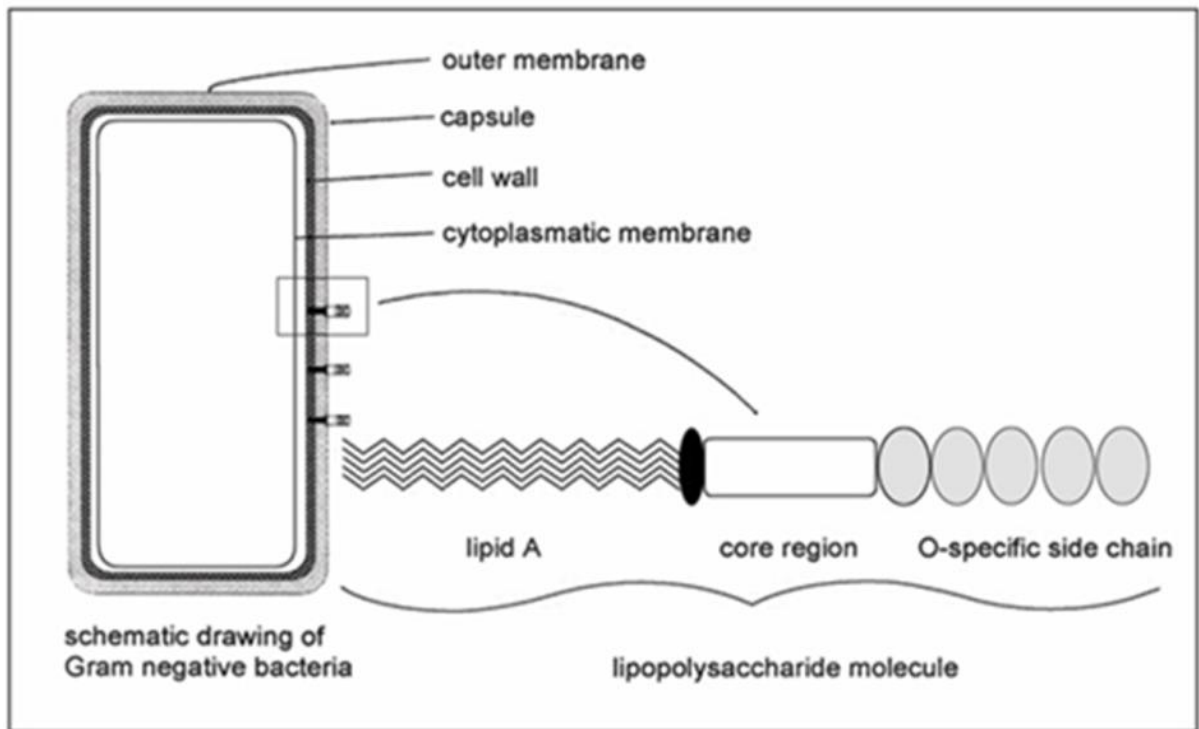
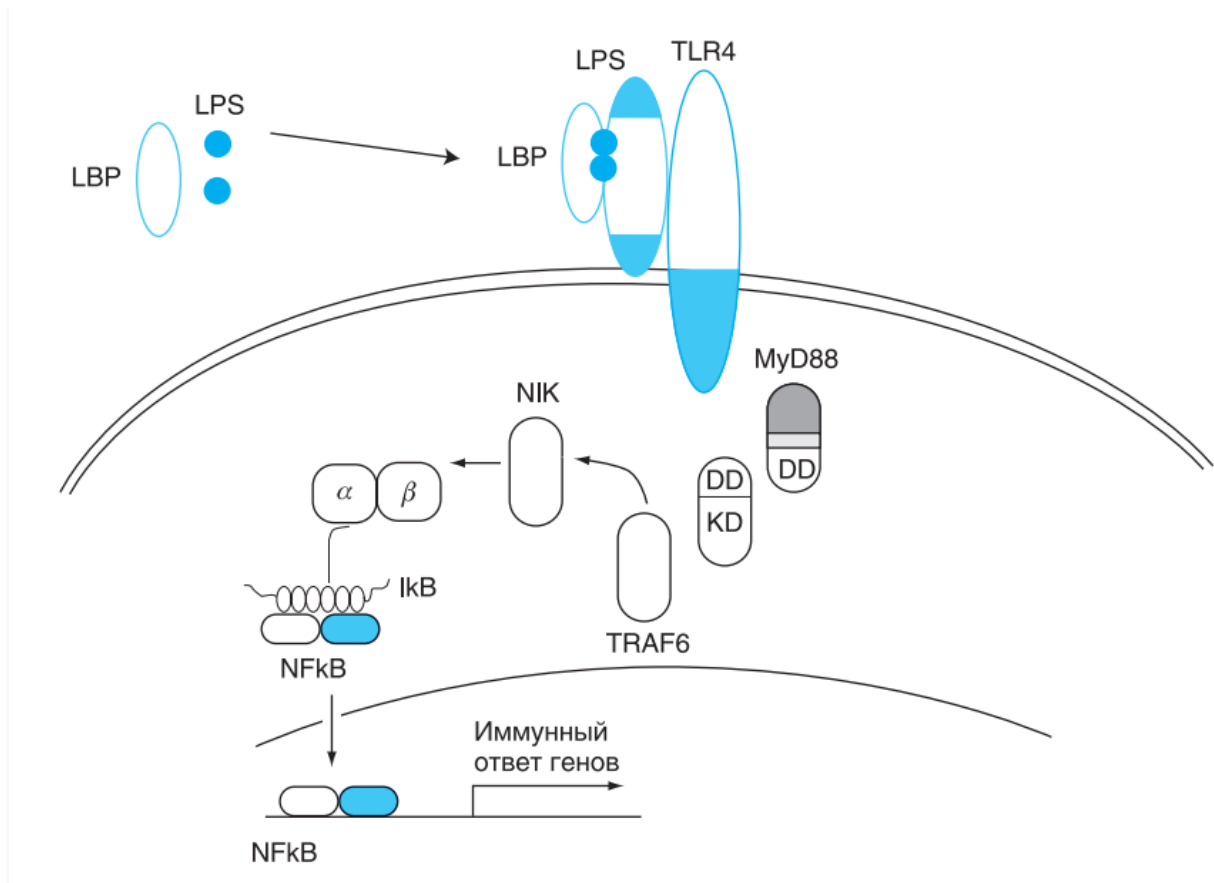


Рис.13 Схема строения липополисахарида. Боковые полисахаридные цепи (O-антиген), центральный олигосахарид и липид А.



В.Т. Ивашкин 2008.

Рис. 14 Схема механизма действия липополисахарида.

**Физиологически активные вещества, изменяющие проницаемость эпителия.** В настоящее время основным подходом при изучении вклада отдельных белков плотных контактов в процессы парацеллюлярного транспорта является исследование влияния их оверэкспрессии (или напротив, сайленсинга) на такие физиологические параметры как трансэпителиальное сопротивление и проводимость для различных ионов. Модельными объектами в этом случае являются культуры клеток (чаще всего клетки MDCK или LLC-PK1). Однако у данного подхода есть ряд существенных ограничений.

Прежде всего, данные эпителиальные клетки уже экспрессируют белки плотных контактов эндогенно и влияние экзогенной экспрессии других белков на их фоне может быть незаметно. Это значительно осложняет фиксирование и интерпретацию полученных результатов. Кроме того, необходимо понимать, что применение такого искусственного подхода может нарушать равновесие между цитоплазматическими и трансмембранными структурными белками плотных контактов (последних становится больше). Последствия таких нарушений очень сложно предугадать. Также изменяются взаимодействия (как гомофильные, так и гетерофильные) самих трансмембранных белков между собой. Таким образом, данная методика не лишена существенных недостатков.

Другим подходом в исследовании роли клаудинов и других белков плотных контактов является применение физиологически активных веществ, изменяющих проницаемость эпителия. Зная физиологическое влияние тех или иных веществ на транспортирующие свойства эпителия и его проницаемость, а также трансэпителиальное сопротивление можно наблюдать изменение в экспрессии тех или иных белков плотных контактов. Таким образом, мы получаем комплексный ответ клетки на физиологический стимул. Поскольку изменение трансэпителиального сопротивления очень сильно коррелирует с изменениями парацеллюлярной проницаемости, можно



делать выводы об участии тех или иных белков плотных контактов в межклеточном транспорте .

Именно такой подход использован в данной работе. К веществам, изменяющим проницаемость эпителиальных клеток и тканей, относятся холерный токсин.

**Холерный токсин.** Холерный токсин вырабатывается холерным вибрионом *Vibrio cholerae*, который относится к адгезивным микроорганизмам, колонизирующим поверхность энтероцитов. Холера представляет собой тип инфекции, патогенез которой связан с нарушением абсорбции солей в кишечном эпителии, вызываемым продукцией холерного токсина.

Холерный токсин – это гексамерный белок массой 86 кДа состоящий из одной А-субъединицы (240 а.к., М~27,5 кДа) и пяти В-субъединиц (103 а.к., М~11,8 кДа). Кристаллографический анализ показал, что В-субъединицы объединены и образуют кольцо, а А-субъединица состоит из 2-х различных доменов А1 и А2, соединенных дисульфидным мостиком. Домен А1 обеспечивает ферментативную активность всего комплекса, в то время как домен А2 отвечает за заякоривание домена А1 к пентамеру В-субъединиц (De Naan et al., 2004).

Первым этапом взаимодействия холерного токсина и энтероцитов является связывание В-субъединиц с ганглиозидом GM1. GM1 представляет собой сложный липид, располагающийся в наружном слое плазматической мембраны практически всех видов клеток, включая энтероциты, лимфоциты, фибробласты, клетки эндотелия и др. (Cuatrecasas, 1973). Известно, что ганглиозиды GM1 располагаются преимущественно в богатых гликофинголипидами микродоменах плазматической мембраны (DIG), которые, в свою очередь, играют важную роль в процессах клатрин-независимого эндоцитоза и сигнальной трансдукции (De Naan et al., 2004). Сравнительно недавно появилась информация о том, что В-субъединица

холерного токсина может связываться также с GD1b, GQ1b, GD1a и другими ганглиозидами, но со значительно меньшей афинностью по сравнению с GM1 (Lauer et al., 2002).

После связывания с GM1 холерный токсин эндоцитируется и направляется к цистернам аппарата Гольджи в составе цитоплазматических везикул. Большую роль в этих процессах играют белки семейства малых ГТФаз – Rab7 и Rab9 (Choudhury et al., 2002). Затем с помощью ретроградного транспорта холерный токсин перенаправляется в эндоплазматический ретикулум в составе COP1 везикул. В дальнейшем А1-домен высвобождается из А2-В<sub>5</sub> комплекса с помощью специфических шаперонов эндоплазматического ретикулума и транслоцируется в цитозоль через Sec61-канал (Hazes et al., 1997).

В цитозоле А1-субъединица становится энзиматически активной и обеспечивает необратимое АДФ-рибозилирование G-белков. Поскольку G-белки вовлечены в регуляцию большого количества сигнальных путей, холерный токсин оказывает влияние на множество метаболических процессов. Основной мишенью холерного токсина является G<sub>s</sub>-белок. АДФ-рибозилирование α-субъединицы G<sub>s</sub>-белка по остатку аргинина инактивирует его ГТФ-азную активность. Блокирование гидролиза ГТФ позволяет модифицированной α-субъединице G<sub>s</sub>-белка постоянно активировать аденилатциклазу, что ведет к увеличению цАМФ в энтероцитах (De Naan et al., 2004). Совокупность данных процессов представлена на рис. 15.

В дальнейшем при участии зависимой от цАМФ протеинкиназы А происходит фосфорилирование апикальных Cl<sup>-</sup> селективных каналов. Эти каналы в апикальной мембране энтероцитов формируются с помощью белков CFTR. Белки CFTR, являющиеся одним из типов апикальных хлорных каналов в кишечном эпителии, также синтезируются в почке, легких и других эпителиальных тканях (Crawford et al., 1991). Фосфорилирование CFTR через активацию аденилатциклазы, увеличивает время открытия

апикальных Cl<sup>-</sup>-каналов. В конечном счете, это завершается тяжелой секреторной потерей солей и воды, опасной для жизни. При диарее, помимо хлора, в жидкости, поступающей в просвет кишки, присутствует натрий (Sack et al., 2004). Таким образом, действие холерного токсина создает условия, при которых происходит транспорт ионов натрия из межклеточной жидкости в просвет кишки по парацеллюлярному пути.

Хорошо известно, что проницаемость эпителия и функциональное состояние плотных контактов находится под контролем сигнальных систем клетки. В частности, показано влияние аденилатциклазной системы на проницаемость плотных контактов в различных клетках и тканях, которую экспериментально можно стимулировать с помощью холерного токсина (Duffey et al., 1981). Воздействие холерного токсина на клетки кишечного эпителия снижает трансэпителиальное сопротивление и усиливает поток ионов натрия и хлора в полость кишки. В современной литературе описан транспорт натрия через плотные контакты по парацеллюлярному пути (Amasheh et al., 2002). Таким образом, действие холерного токсина позволяет создать модельные условия направленного транспорта ионов натрия по парацеллюлярному пути.

Однако неизвестно влияет ли холерный токсин непосредственно на молекулярные детерминанты плотных контактов. Именно на изучение данного аспекта направлена наша работа.

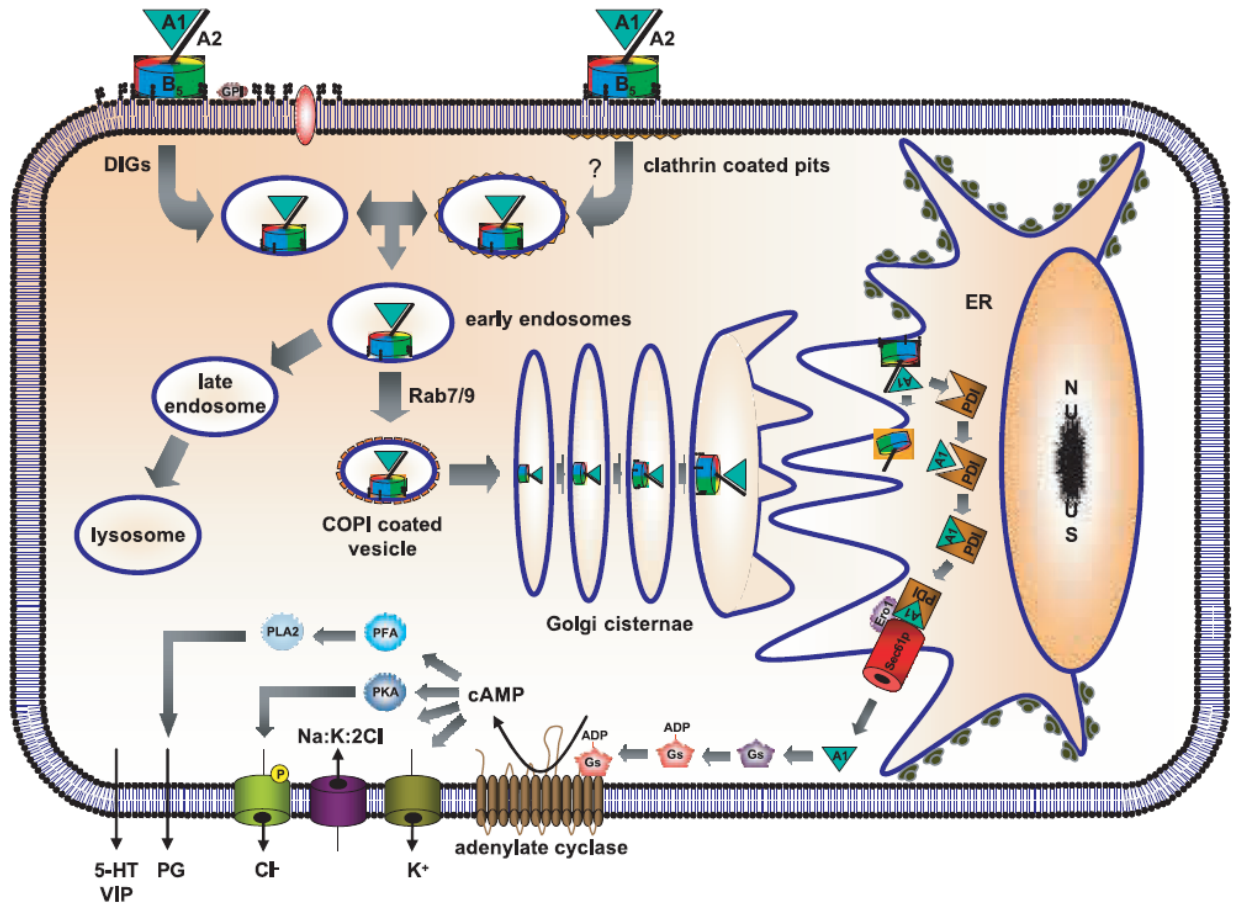


Рис. 15. Механизм действия холерного токсина (De Haan et al., 2004)

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1. Общие подходы к организации экспериментов на животных

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.

В диссертационной работе опыты проводили на участке кишки методом выведения ее сегментов, что дает возможность исследовать проницаемость стенки кишки в условиях сохранения кровоснабжения и иннервации. Таким образом, регистрируемые параметры могут быть исследованы на фоне системных, местных и тканевых факторов регуляции. Кроме этого, данный методический подход позволяет получить образцы ткани, наиболее соответствующие интактному (нативному) состоянию кишки крысы.

После наркотизирования у крыс продольно рассекали кожу на вентральной поверхности туловища, затем делали разрез мышц по белой линии и выводили наружу выбранный сегмент кишки. Длина тонкой кишки крысы, которая подразделяется на двенадцатиперстную, тощую и подвздошную, составляет 1,10 м (Ноздрачев, Поляков, 2001) (таб.1). Известно, что по продольной оси кишки в направлении от проксимального участка к дистальному изменяются барьерные свойства кишки (Markov et al., 2010). Для того, чтобы добиться сопоставимости результатов, полученных в разных опытах, был использован принцип картирования участка кишки, на котором проводили исследование (Markov et al., 2010; Марков, Amasheh, 2011). Была выбрана точка начального отсчета для выбора участка проведения опытов, учитывая принятое анатомическое деление ее на отделы (двенадцатиперстная, тощая, подвздошная, толстая).

Таблица 1. Соотношения различных отделов тонкой кишки

Сегмент кишки	Длина
Двенадцатиперстная	20 – 40 см
Тощая	60 – 80 см
Подвздошная	6 – 10 см

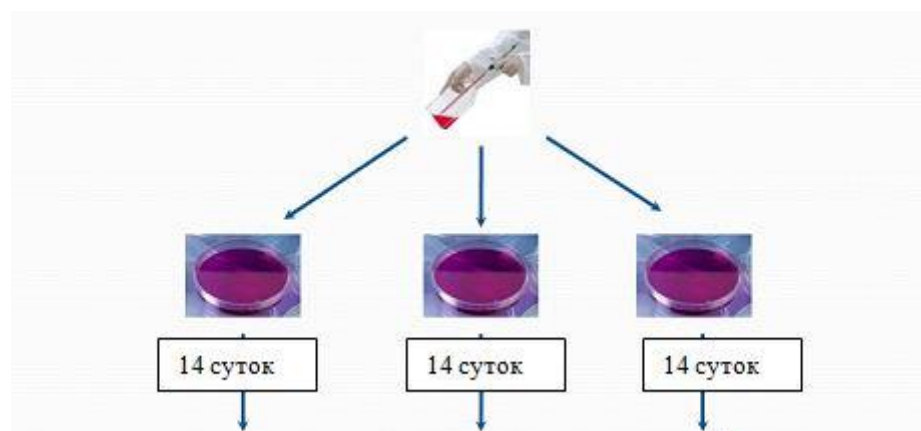
Окончание двенадцатиперстной кишки служило реперной точкой. От данной точки отступали 10 см в каудальном направлении. В начальный участок выбранного сегмента кишки, делая надрез ее стенки, вводили приводящий катетер. Этот катетер соединяли с сосудом, содержащим раствор Кребса-Рингера (ммоль/л): 119 NaCl, 5 KCl, 1,2 MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 0,4 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 1,6 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O, 1,2 CaCl<sub>2</sub> и исследуемые вещества в контрольных и опытных сериях, соответственно. В дистальный отдел исследуемого сегмента идентичным способом вводили выводящий катетер. Предварительно через катетеры промывали полость тощей кишки раствором Кребса-Рингера. Крепление катетеров в полость исследуемых сегментов осуществляли с помощью наложенных на кишку лигатур. Инкубацию с растворами проводили в течение двух часов, после чего ткань сегмента иссекали для фиксации различными способами: для электронной микроскопии помещали в 2,5%-ый раствор глутаральдегида на буфере

Хенкса; для Вестерн блот образцы помещали в холодильник на  $-70^{\circ}\text{C}$ . После завершения экспериментов животных умерщвляли летальной дозой наркоза.

В электрофизиологических опытах животное умерщвлялось летальной дозой наркоза. После этого по описанному выше методу проводили препарирование сегмента тощей кишки и осуществляли его монтировку в камеру Уссинга.

## 2.2. 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 (Biochrom, Германия). Клетки культивировали при  $37^{\circ}\text{C}$  в атмосфере, содержащей 5%  $\text{CO}_2$ . 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 ( $\approx 1\text{ кОм}$ ).



Эксперимент в камере Уссинга

Контрольные пробы    Холерный токсин    Липополисахарид

### **2.3 Регистрация электрофизиологических характеристик ткани кишки и культуры клеток в камере Уссинга**

Трансэпителиальное сопротивление измеряли в камере Уссинга для оценки проницаемости стенок тощей кишки. Камера Уссинга представляет собой цилиндр из плексиглаза, состоящий из двух половин, между которыми помещается ткань (рис.16).

Для регистрации электрофизиологических характеристик к камере подведены две пары электродов: два электрода для регистрации тока, два электрода для регистрации напряжения. Каждая половина камеры с помощью специальных мостов сообщается с сосудом, в котором находится раствор, омывающий эпителиальную ткань. Сосуд имеет два колена, растворы в которых не смешиваются, что позволяет осуществлять воздействие различными веществами с апикальной или базальной стороны эпителия. Через этот сосуд также осуществляется аэрация раствора, омывающего эпителий с мукозной и серозной стороны. Резервуар с омывающим раствором для ткани имеет наружный контур, по которому циркулирует вода, поступающая из термостата для поддержания и регуляции температуры используемого раствора.

Перед каждым экспериментом камеру с сообщающимся сосудом наполняли 5 мл раствора Кребса-Рингера, который в ходе опыта омывал исследуемую ткань. В отсутствие препарата производили балансировку и компенсирование напряжения между электродами. Затем раствор сливали, участки эпителиальной ткани после выделения сегментов и препарирования монтировали в камеру Уссинга, после чего с серозной и мукозной стороны эпителия в камеру добавляли по 5 мл раствора.

Стеклянный резервуар имел водяную рубашку для контроля температуры омывающего раствора (37°C) и порт для аэрации карбогеном (95% O<sub>2</sub> и 5% CO<sub>2</sub> ). В ходе эксперимента в камеру Уссинга с апикальной стороны добавляли липополисахарид или холерный токсин в концентрации 20 мкг/мл и 1 мкг/ мл, соответственно.



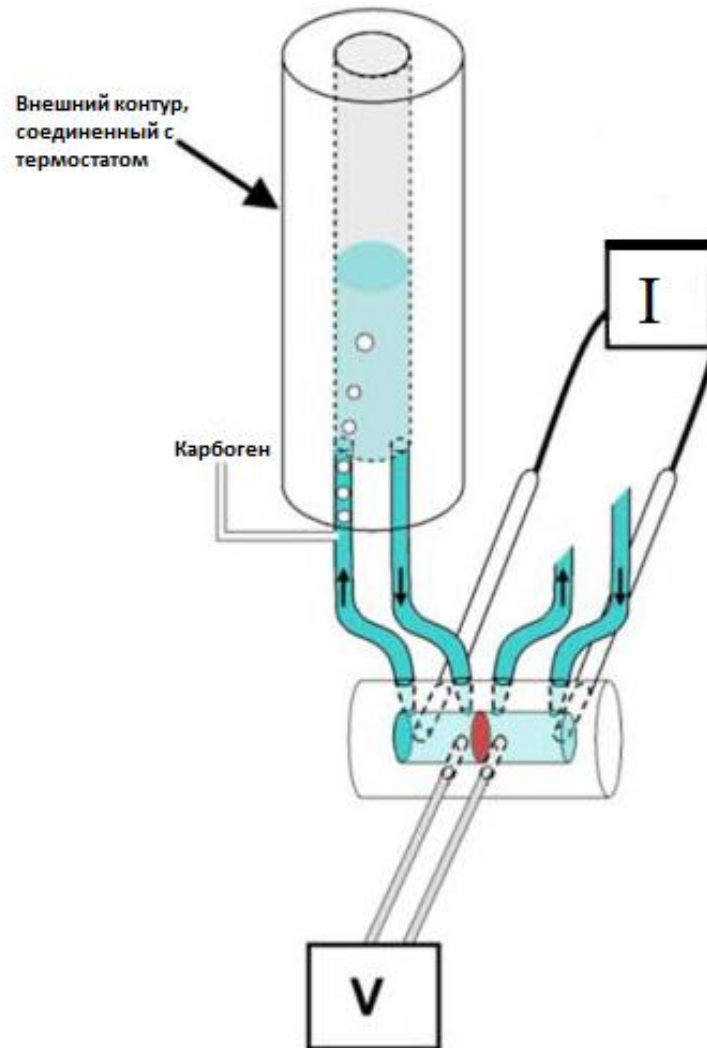


Рис. 16. Схема камеры Уссинга. V – электроды для регистрации напряжения, I – электроды для регистрации тока, стрелки указывают на движение раствора, омывающего эпителий (Clark, 2009).

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 ( $\text{Ом}^*/\text{см}^2$ ).

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

Камера Уссинга для клеточных культур имеет аналогичное строение. Вместо ткани в начале эксперимента в камеру монтировали фильтры с клетками. По завершению эксперимента фильтры с клетками извлекали из камеры Уссинга и проводили их фиксацию в Рiра-буфере (Германия) для проведения Вестерн-блот анализа.

**2.4. 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 холерный токсин и липополисахарид в концентрациях 1 мкг/мл и 20 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 ( $\text{см}^2$ );  $C_0$  — концентрация маркера в растворе с мукозной стороны в начальный момент времени (моль/л); Учитывая соотношение  $1 \text{ л} = 1000 \text{ см}^3$ , размерность проницаемости выражается в см/с.

**2.5. Электронная микроскопия.** Для получения ультратонких срезов ткань фиксировали 2,5%-ым раствором глутаральдегида в растворе Хенкса (рН = 7,0) в течение 2 ч при температуре 4°C. Затем отмытые раствором Хенкса пробы подвергали вторичной фиксации 1%-ым раствором четырехоксида осмия ( $\text{OsO}_4$ ) на основе того же раствора Хенкса в течение 2 ч при температуре 4°C. Фиксированные  $\text{OsO}_4$  клетки после отмывки раствором Хенкса помещали в 2%-ый раствор уранилацетата на ацетатном буфере (рН=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-100C (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.

**2.6. 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). Далее ткань растирали до гомогенного состояния. Полученную суспензию помещали в эппендорфы и прокачивали с помощью шприцев с различными диаметрами игл для

получения максимально гомогенного раствора. Суспензию центрифугировали в течение 5 мин при 200g (4°C) для разделения фракций белков мембраны и цитоплазмы клеток. Растворимую фракцию, содержащую мембранные белки помещали в новые эппендорфы и центрифугировали при 43000g (4°C) в течение 30 мин. К осажденной фракции добавляли 100 мкл охлажденного TRIS-буфера (20 mM Tris, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 0.3 mM EGTA) и прокачивали несколько раз через инсулиновый шприц до полного растворения осадка.

*Количественное определение белка.* Для определения количества всех мембранных белков, содержащихся в растворе, по стандартному протоколу заполняли планшет, где в качестве контроля помещались бидистиллированная вода, лизирующий буфер и растворы с содержанием белка 0.2, 0.8 и 1.2 мкг/мкл, относительно которых измерялась концентрация мембранных белков в исследуемых пробах. В каждую заполняемую ячейку добавляли по 190 мкл стандарта ВСА, определение белка проводили по Пирсу (Pierce, Rockford, Ill., США). После заполнения соответствующих ячеек, планшет на 30 мин помещали в термостат (37°C), после чего охлаждали до комнатной температуры. 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.

*Электрофорез в полиакриламидном геле.* Перед вертикальным электрофорезом аликвоты мембранных белков (5 мкг) с добавлением лизирующего буфера и SDS-буфера Laemmli (Sigma, США) нагревали в течение 5 мин при температуре 95°C. В полиакриламидный гель с содержанием SDS 12.5% помещались пробы исследуемых растворов мембранных белков в объеме 25 мкл. Гели, содержащие пробы и маркеры BenchMark™ Prestained Protein Ladder (Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe, Германия), в камерах попарно помещались в буферный раствор

для электрофореза (10% 10 x буфер West; 89% бидистиллированной воды; 1% SDS (10%)). Затем в течение 120 мин через гели пропускали электрический ток с напряжением 100 В.

*Электроперенос белков на мембрану.* Гели с вертикально распределенными в соответствии с массой белками клеточной мембраны помещали в буфер для электропереноса на мембрану (10% 10 x буфер West; 80% бидистиллированной воды; 10% метанола). PVDF (polyvinylidene difluorid) мембраны (PolyScreen, Perkin Elmer Life Sciences) предварительно обрабатывают 100%-ым этанолом в течение 5 мин. Поддерживалось постоянное напряжение, равное 100 В.

*Иммунодетекция белков плотных контактов.* Гидрофобную мембрану 5 мин промывают в растворе PBST (95.5% PBS, 0.5% Tween 20). Затем блокируют в TBST буфере (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20) в течение 2 ч при комнатной температуре, инкубируют с первичными антителами (Zymed Laboratories, США) (в концентрации 1 мкг/мл TBST) в течение 1ч. при комнатной температуре: к клаудинам-2,-4, -7, -8 (1:1000). Затем мембраны дважды по 10 мин промывают в PBST, один раз в TBST в течение 10 мин и инкубируют со вторыми антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена (разведение в TBST в концентрации 1:2000) (MoViTec, Германия). После того, как мембраны на 5 мин помещали в растворе Lumi-LightPLUS (Roche Diagnostics, Germany) для визуализации белков, проводили хемилюминисцентное определение белков плотных контактов. Детекцию и идентификацию белков проводили в анализаторе изображений LAS-1000 (Fujifilm, Japan). Для каждого опыта определяли плотность  $\beta$ -актина, как внутреннего контроля. При процедуре иммунодетекции, использовали первичные антитела к  $\beta$ -актину (1:5000).

*Денситометрия.* 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).

## 2.7. Фармакологические соединения

Одним из подходов в исследовании роли клаудинов и других белков плотных контактов является применение физиологически активных веществ, изменяющих проницаемость эпителия. В данной работе в качестве таких веществ использованы липополисахарид и холерный токсин. Во всех опытах использовали реактивы фирмы Sigma Aldrich (Германия). Выбранные концентрации соответствуют данным литературы.

Липополисахарид (Lipopolysaccharides из клеток *Escherichia coli* 0111:B4) применялся в концентрации 20 мкг/мл (Yang et al., 2014). Время инкубации ткани с липополисахаридом составляло 1 час. (Mikawa, 2015).

Концентрация холерного токсина (Cholera toxin из *Vibrio cholera*) была 1 мкг/мл (Taylor et al., 2011). Для инкубации с холерным токсином было выбрано время равное 2 часам, на основании опубликованных ранее работ. (Markov et al., 2014).

Для анализа фармакологической активности канала CFTR и транспортера  $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$  в работе использовали буметанид (0,01 mM) и теофиллин (10 mM).

Буметанид представляет собой диуретик из сульфамидной категории. Он способен блокировать поступление  $\text{Cl}^-$  в эпителиоциты, что снижает секрецию ионов хлора в просвет кишки (Wang et al., 2007).

Теофиллин является производным семейства ксантинов. Теофиллин действует через повышение концентрации цАМФ (Хендерсон, 2005). Это приводит к усилению секреции ионов хлора, за счет длительного открытия апикального  $\text{Cl}^-$  канала CFTR и фосфорилирования  $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$  транспортера.

## 2.8. 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.

### ГЛАВА 3. ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ТОЩЕЙ КИШКИ КРЫСЫ И ЛИНИИ КЛЕТОК IPEC-J2 ПРИ ДЕЙСТВИИ ХОЛЕРНОГО ТОКСИНА И ЛИПОПОЛИСАХАРИДА

#### **3.1. Трансэпителиальное сопротивление эпителия тощей кишки и клеток линии IPEC-J2 под действием холерного токсина и липополисахарида**

Барьерные свойства эпителия оценивают по изменению трансэпителиального сопротивления, которое отражает трансцеллюлярную и парацеллюлярную проницаемость ионов через эпителиальный пласт. Необходимым условием его существования является наличие структур, обеспечивающих межклеточную изоляцию базальной и апикальной части клеток (Cerejiido et al, 2004). Такими структурами, в том числе в эпителии кишки, являются плотные контакты.

*Изменение трансэпителиального сопротивления эпителия кишки при действии холерного токсина.* Изначальная величина трансэпителиального сопротивления эпителия тощей кишки в контрольной группе животных была равна  $39 \pm 5 \text{ Ом}\cdot\text{см}^2$ . В ходе инкубации ткани в камере Уссинга значение сопротивления достоверно не изменялось, составляя  $38 \pm 6 \text{ Ом}\cdot\text{см}^2$  к 60-й минуте и  $34 \pm 6 \text{ Ом}\cdot\text{см}^2$  – к 120-й минуте ( $p \geq 0,05$ ;  $n=8$ ; U-критерий Манна-Уитни) (рис.17А).

Добавление холерного токсина (1 мкг/мл) в раствор со стороны эпителия кишки привело на 90-й минуте инкубации к достоверному снижению трансэпителиального сопротивления с  $41 \pm 3 \text{ Ом}\cdot\text{см}^2$  до  $34 \pm 2 \text{ Ом}\cdot\text{см}^2$  ( $p < 0,05$ ;  $n=12$ ; U-критерий Манна-Уитни). Продолжение инкубации с холерным токсином сопровождалось снижением трансэпителиального сопротивления, которое к 120-й минуте составило  $33 \pm 2 \text{ Ом}\cdot\text{см}^2$  ( $p < 0,05$ ;  $n=12$ ; U-критерий Манна-Уитни) (рис.17А).

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 ( $p < 0,05$ ;  $n=9$ ; U-критерий Манна-Уитни) (рис.19А).

Применение буметанида (0,01 mM) с базолатеральной стороны клеток на фоне действия холерного токсина привело к достоверному снижению тока «короткого замыкания» с  $138 \pm 28$  до  $96 \pm 26$  мкА/см<sup>2</sup> ( $p < 0,05$ ;  $n=5$ ; U-критерий Манна-Уитни).

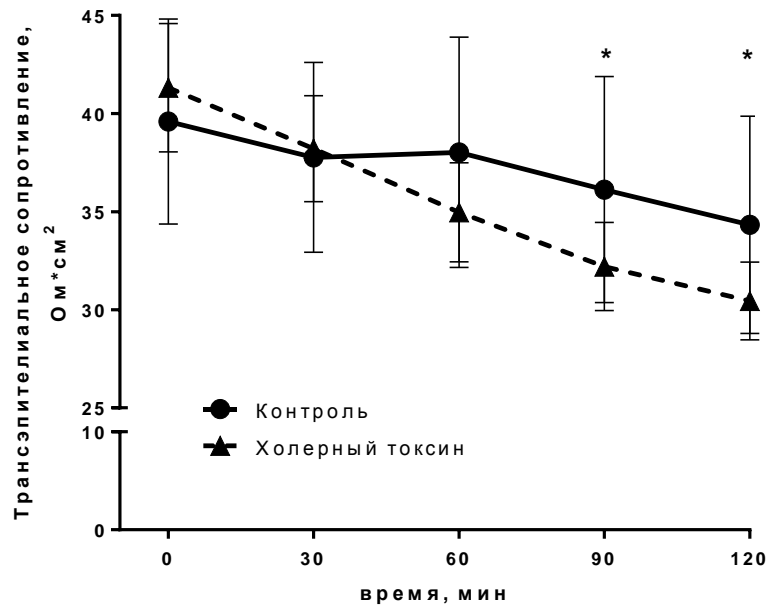
Теofilлин (10 mM) вызывал противоположную реакцию. При его внесении в инкубационный раствор на фоне действия холерного токсина происходило увеличение тока короткого замыкания с  $51 \pm 11$  до  $81 \pm 18$  мкА/см<sup>2</sup> ( $p < 0,05$ ;  $n=5$ ; U-критерий Манна-Уитни).

*Изменение трансэпителиального сопротивления клеток линии ИРЕС-J2 при действии холерного токсина.* Первоначальная величина трансэпителиального сопротивления клеток линии ИРЕС-J2 в контрольных и опытной серии экспериментов составляла  $372 \pm 40$  Ом·см<sup>2</sup> ( $n=7$ ) и  $400 \pm 46$  Ом·см<sup>2</sup> ( $n=8$ ), соответственно. Значение трансэпителиального сопротивления контрольных образцов клеток линии ИРЕС-J2 при инкубации в камере Уссинга достоверно не изменялась. К 60-й минуте величина сопротивления была равна  $392 \pm 38$  Ом·см<sup>2</sup>, а к 210-й минуте –  $434 \pm 37$  Ом·см<sup>2</sup> ( $p \geq 0,05$ ;  $n=7$ ; U-критерий Манна-Уитни) (рис.18А).

Добавление холерного токсина (1 мкг/мл) в среду инкубации с апикальной стороны также не вызвало достоверных изменений трансэпителиального сопротивления линии клеток ИРЕС-J2 относительно исходного значения. К 60-й минуте величина сопротивления была равна  $369 \pm 48$  Ом·см<sup>2</sup>, к 210-й минуте –  $367 \pm 47$  Ом·см<sup>2</sup> ( $p \geq 0,05$ ;  $n=8$ ; U-критерий Манна-Уитни) (рис.18А).

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.20А).

А.



Б.

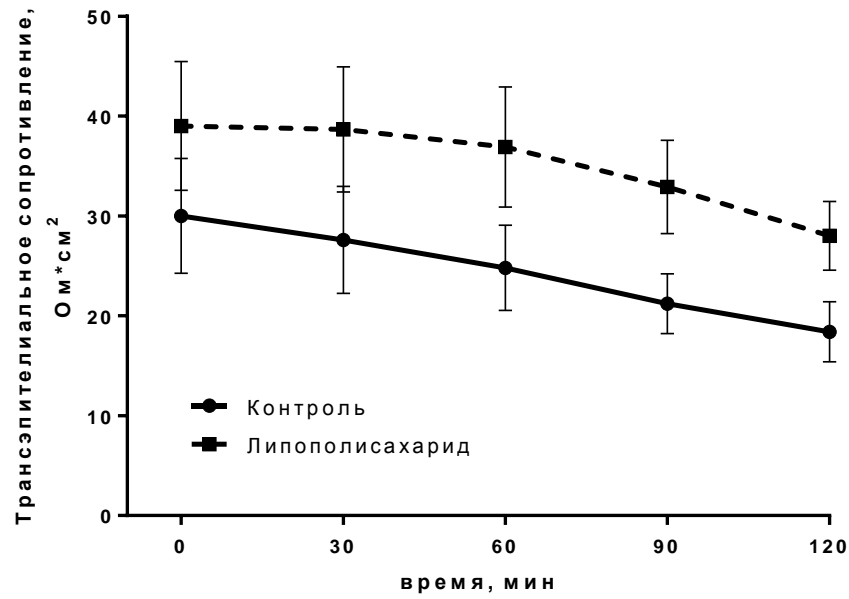
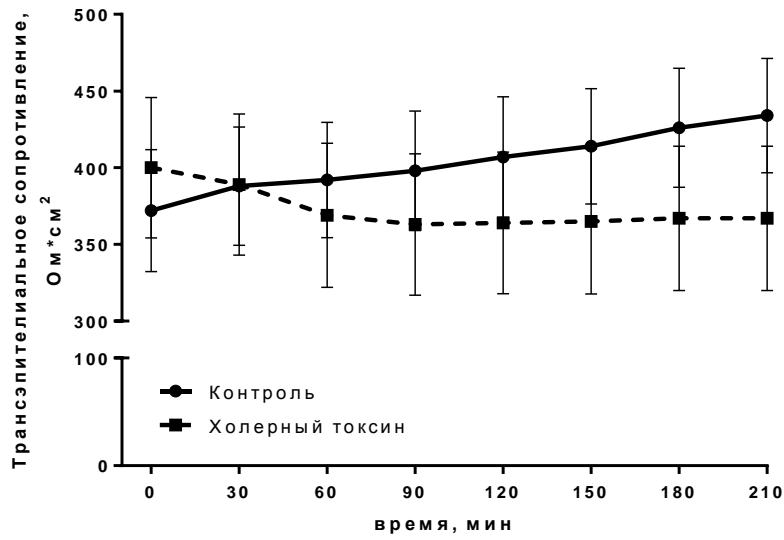


Рис. 17. Влияние холерного токсина (А) и липополисахарида (Б) на трансэпителиальное сопротивление эпителия тощей кишки

\* –  $p \leq 0,05$  относительно исходного значения при действии холерного токсина.

А.



Б.

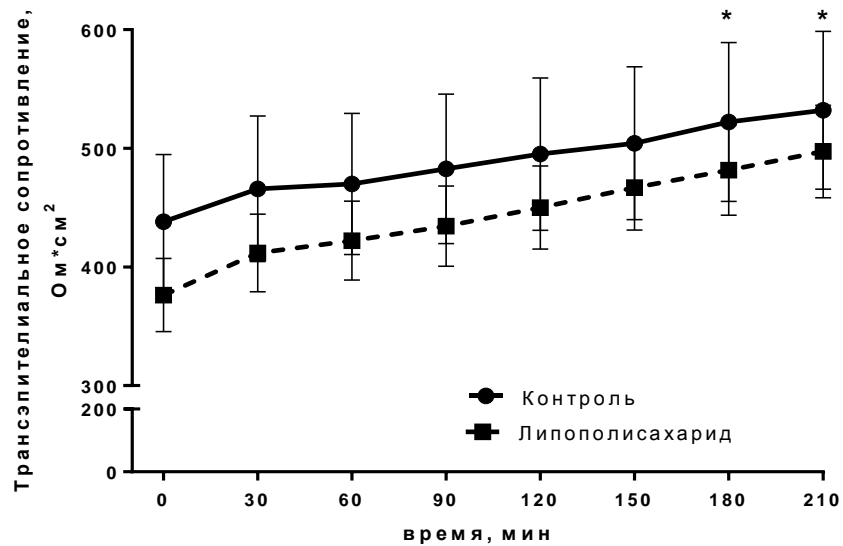
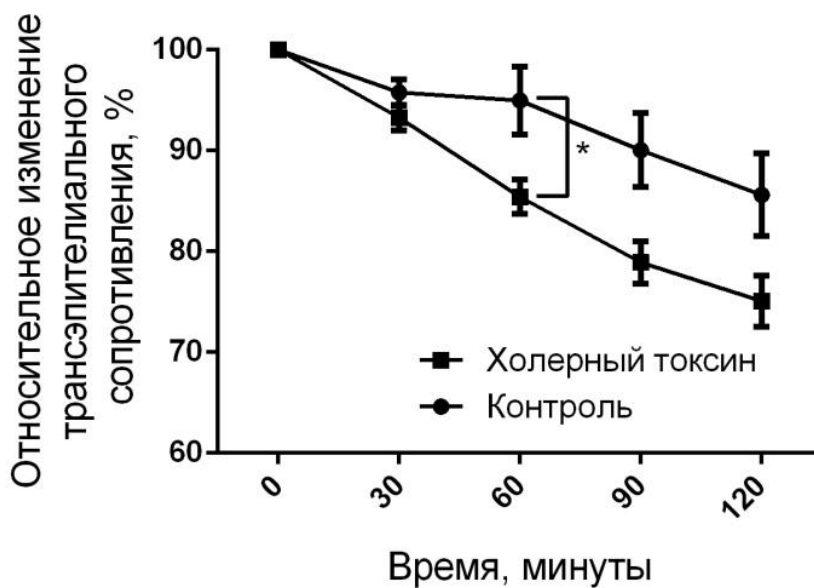


Рис. 18. Влияние холерного токсина (А) и липополисахарида (Б) на трансэпителиальное сопротивление клеток линии IPEC-J2

\* –  $p \leq 0,05$  относительно исходного значения при действии холерного токсина.

А.



Б.

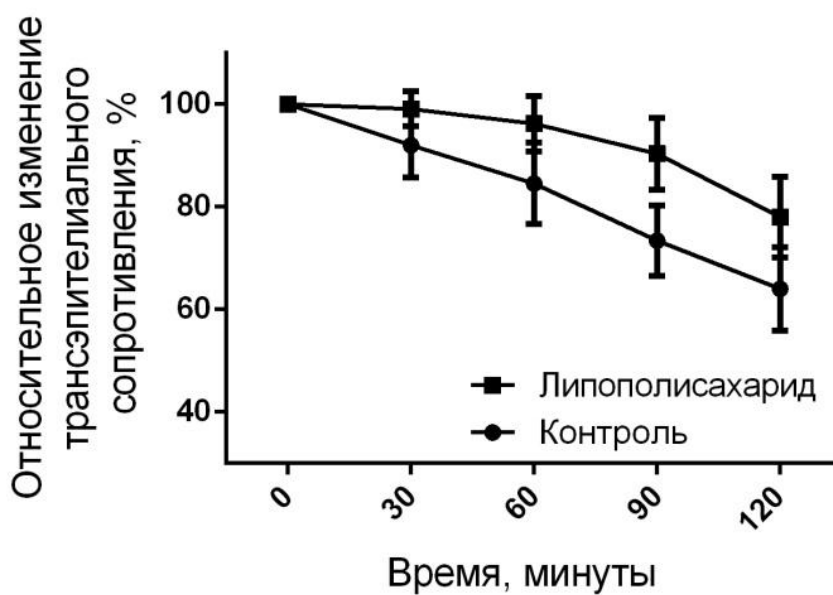
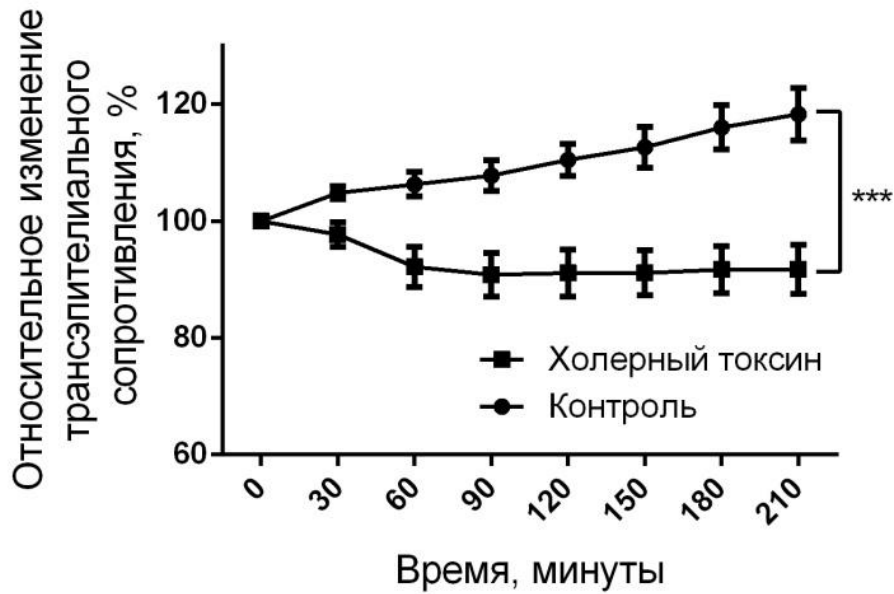


Рис.19. Влияние холерного токсина (А) и липополисахарида (Б) на относительное изменение трансэпителиального сопротивления эпителия тощей кишки

\* –  $p \leq 0,05$ ; А,Б- относительно контрольного значения при действии холерного токсина.

А.



Б.

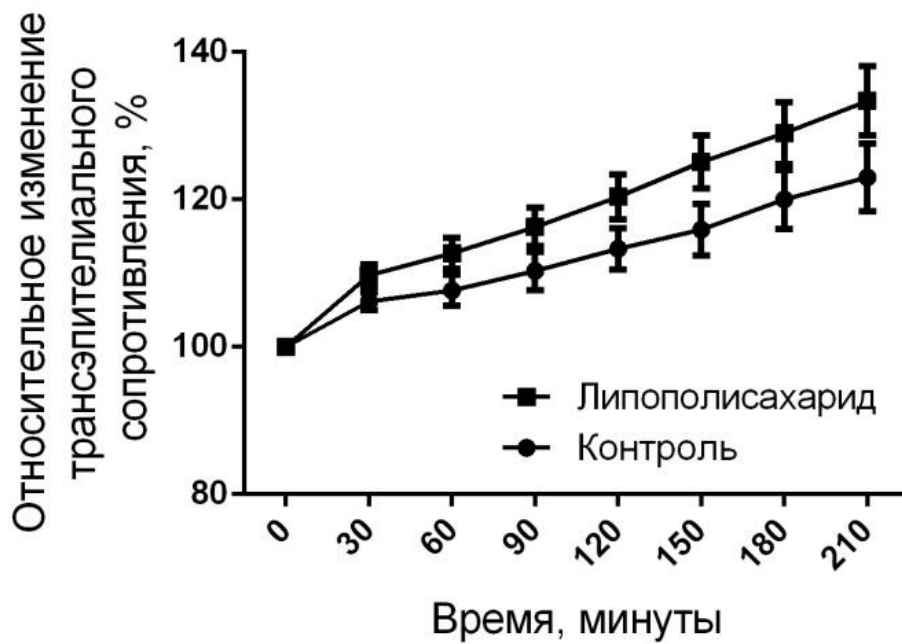


Рис.20. Влияние холерного токсина (А) и липополисахарида (Б) на относительное изменение трансэпителиального сопротивления клеток линии IPEC-J2

\* –  $p \leq 0,05$ ; А,Б- относительно контрольного значения при действии холерного токсина.

*Изменение трансэпителиального сопротивления эпителия кишки при действии липополисахарида.* В серии экспериментов при изучении действия липополисахарида первоначальная величина трансэпителиального сопротивления эпителия кишки в контрольной и опытной группах была равна  $30 \pm 7 \text{ Ом}\cdot\text{см}^2$  ( $n=5$ ) и  $39 \pm 6 \text{ Ом}\cdot\text{см}^2$  ( $n=9$ ). Значение сопротивления эпителия контрольных образцов кишки в ходе инкубации достоверно не изменялось. На 60-й минуте величина трансэпителиального сопротивления составляла  $25 \pm 4 \text{ Ом}\cdot\text{см}^2$ , на 120-й минуте –  $18 \pm 3 \text{ Ом}\cdot\text{см}^2$  ( $p \geq 0,05$ ;  $n = 5$ ; U-критерий Манна-Уитни) (рис.17Б).

Внесение липополисахарида (20 мкг/мл) мукозной стороны кишки не вызвало достоверных изменений трансэпителиального сопротивления. На 60-й минуте величина трансэпителиального сопротивления была равна  $39 \pm 6 \text{ Ом}\cdot\text{см}^2$  ( $n=9$ ), на 120-й минуте –  $35 \pm 3 \text{ Ом}\cdot\text{см}^2$  ( $n=5$ ) ( $p \geq 0,05$ ; U-критерий Манна-Уитни) (рис.17Б). Сравнение изменения 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.19Б).

*Изменение трансэпителиального сопротивления клеток линии ИРЕС-J2 при действии липополисахарида.* Трансэпителиальное сопротивление линии клеток ИРЕС-J2 в контрольной серии составило величину  $438 \pm 57 \text{ Ом}\cdot\text{см}^2$  ( $n=10$ ). В ходе инкубации клеток в камере Уссинга их сопротивление достоверно не изменилось. К 60-й минуте оно составило величину  $470 \pm 60 \text{ Ом}\cdot\text{см}^2$  ( $n=10$ ), к 210 минуте –  $510 \pm 15 \text{ Ом}\cdot\text{см}^2$  ( $n=10$ ) ( $p \geq 0,05$ ; U-критерий Манна-Уитни) (рис.18Б).

Добавление липополисахарида (20 мкг/мл) в среду инкубации со стороны апикальной мембраны привело к достоверному повышению трансэпителиального сопротивления линии клеток ИРЕС-J2 с первоначального значения в  $377 \pm 31$  до величины  $400 \pm 38 \text{ Ом}\cdot\text{см}^2$  ( $n=11$ ) и  $450 \pm 20 \text{ Ом}\cdot\text{см}^2$  ( $n=11$ ) к 60-й и 210-й минуте, соответственно ( $p < 0,01$ ; U-критерий Манна-Уитни) (рис.18Б).

Сравнение изменения относительной величины трансэпителиального сопротивления свидетельствует, что липополисахарид не вызывает изменения его величины в линии клеток IPEC-J2 по сравнению со значениями в контрольных образцах ткани (рис.20Б).

### **3.2. Изучение проницаемости слизистой оболочки тощей кишки крысы и линии клеток IPEC-J2 при действии холерного токсина и липополисахарида для флуоресцеина натрия**

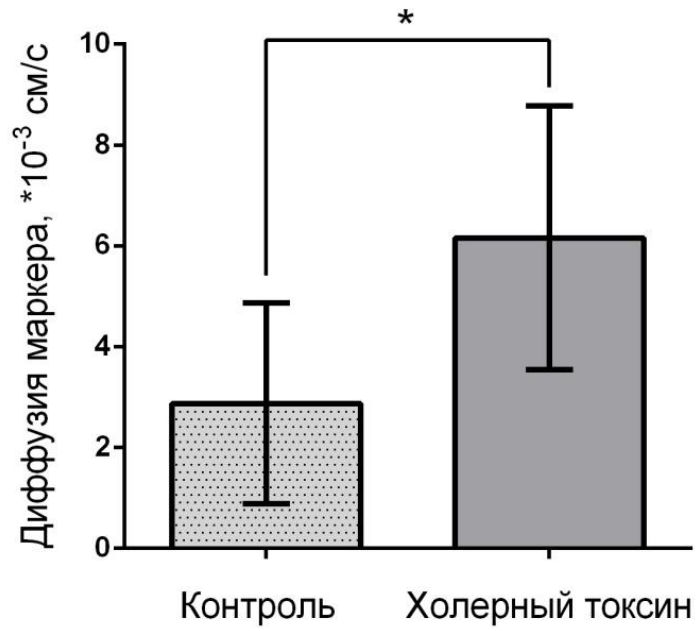
Проницаемость флуоресцеина в контрольных препаратах кишки составила  $2,9 \pm 1,9 \cdot 10^{-3}$  см/с ( $n=7$ ). Действие холерного токсина с апикальной стороны клеток привело к достоверному изменению проницаемости для молекул маркера. Проницаемость ткани кишки при действии энтеротоксина достигла величины  $6,2 \pm 2,6 \cdot 10^{-3}$  см/с ( $n=6$ ), ( $p < 0,05$ ; критерий Манна-Уитни) (рис.21А).

Внесение в среду инкубации с апикальной стороны холерного токсина не приводило к достоверному изменению проницаемости монослоя клеток IPEC-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.22А).

В серии опытов на тощей кишке с липополисахаридом проницаемость для флуоресцеина в контрольной группе составляла  $5,3 \pm 3,3 \cdot 10^{-3}$  см/с ( $n=4$ ). При добавлении липополисахарида в среду инкубации с апикальной стороны проницаемость достоверно не изменилась. Величина диффузии флуоресциана была равна  $5,6 \pm 4,7 \cdot 10^{-3}$  см/с ( $p \geq 0,05$ ;  $n=4$ ; U-критерий Манна-Уитни) (рис.21Б).

Действие липополисахарида на проницаемость монослоя клеток IPEC-J2 для молекул флуоресцеина натрия не приводит к достоверным различиям в проницаемости между контрольной и опытной группой. ( $p \geq 0,05$ ;  $n=34$ ; t-test Стьюдента) (рис.22Б).

А.



Б.

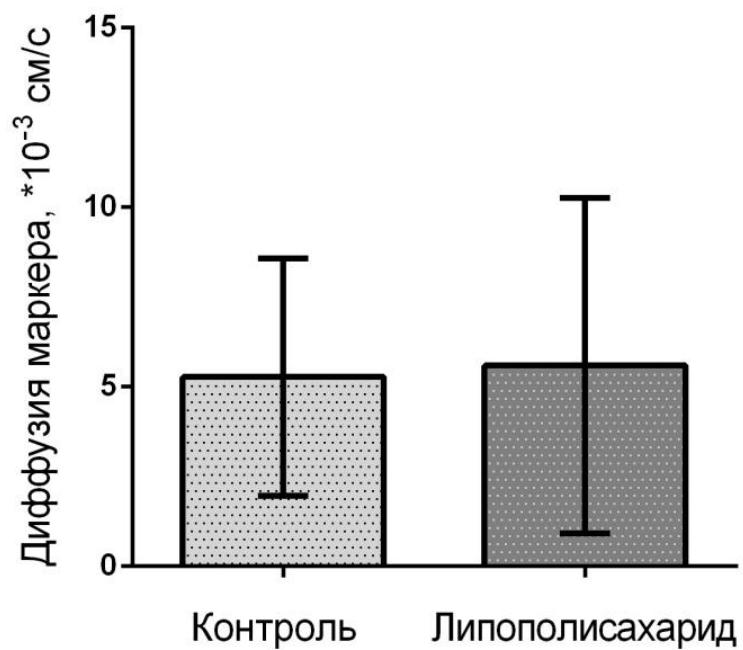
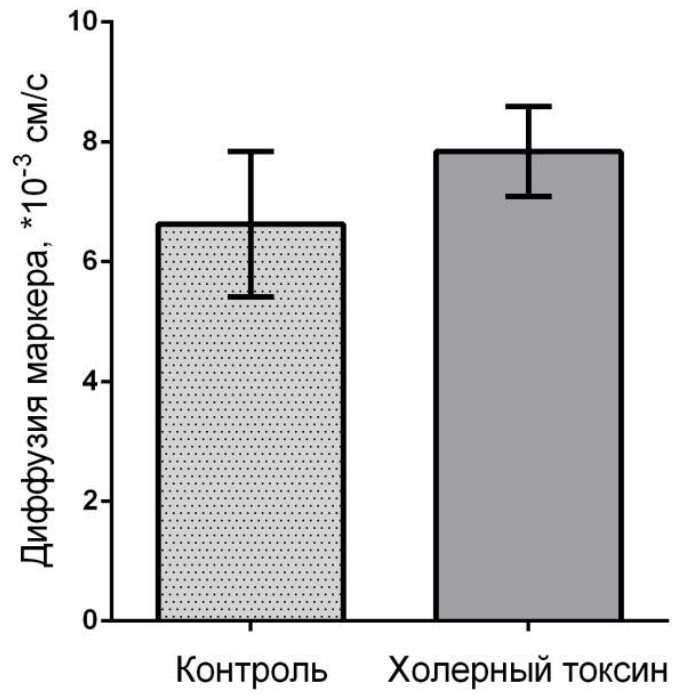


Рис.21. Влияние холерного токсина (А) и липополисахарида (Б) на изменение проницаемости маркера в эпителии тощей кишки

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



А.



Б.

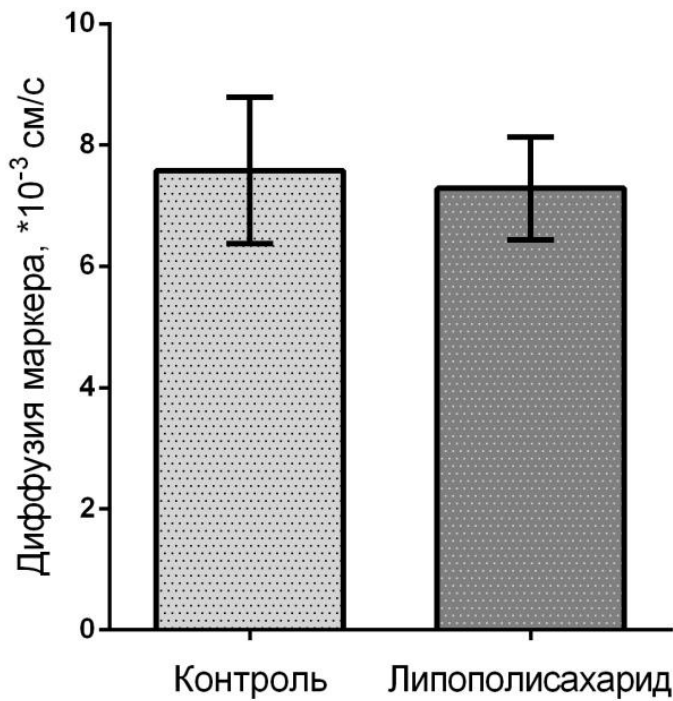


Рис.22. Влияние холерного токсина (А) и липополисахарида (Б) на изменение проницаемости маркера в клетках линии IPEC-J2

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

## ГЛАВА 4. ИССЛЕДОВАНИЕ СТЕНКИ ТОЩЕЙ КИШКИ КРЫСЫ ПРИ ДЕЙСТВИИ ХОЛЕРНОГО ТОКСИНА И ЛИПОПОЛИСАХАРИДА МЕТОДОМ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ

### **4.1. Ультратонкое строение контрольной ткани тощей кишки крыс**

Для анализа ультраструктурных изменений энтероцитов был использован метод трансмиссионной электронной микроскопии. Были исследованы препараты тощей кишки крысы после инкубации ткани кишки с холерным токсином и липополисахаридом.

Энтероциты контрольной ткани тощей кишки на ультратонких срезах представляют собой удлинённые 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.23).

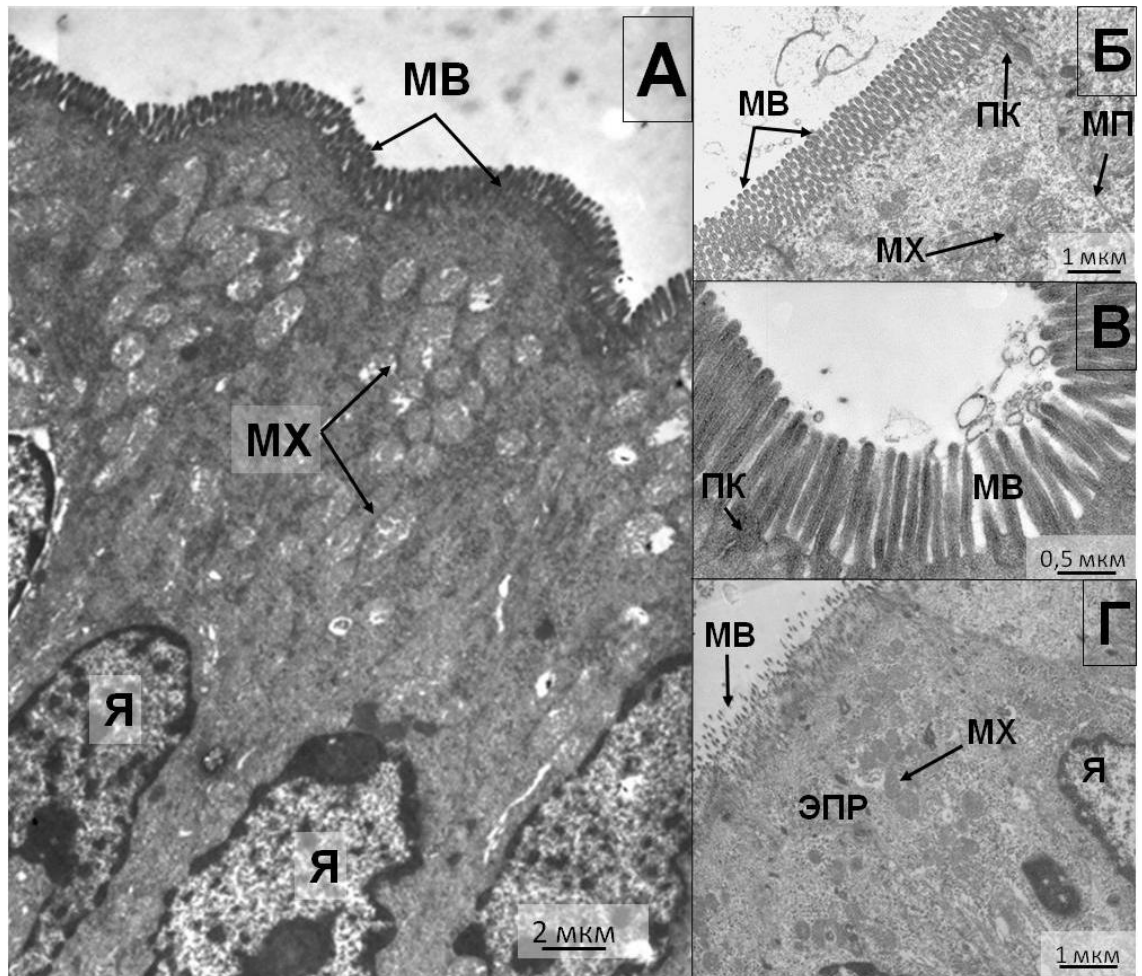


Рис.23. Ультратонкий срез энтероцитов тощей кишки крысы контрольных препаратов. МВ-микроворсинки, МХ-митохондрии, Я-ядра, ПК-плотные контакты, МП-межклеточное пространство, ЭПР-эндоплазматический ретикулум.

**4.2 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.26). В контрольных образцах площадь межклеточного пространства составляет  $0,09 \pm 0,03 \text{ мкм}^2$ . Показано, что при контакте с холерным токсином площадь межклеточного пространства достоверно увеличивается до  $8,5 \pm 4,9 \text{ мкм}^2$  ( $n=5$ ;  $p \leq 0,01$ ; U- критерий Манна-Уитни) (рис.28).

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.28).

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  $11 \pm 1$  органеллы, в то время как в клетках после контакта с холерным токсином их число увеличивалось до  $19 \pm 0,6$  на  $25 \text{ мкм}^2$  ( $n=30$ ;  $p \leq 0,01$ ; t-тест Стьюдента) (рис.28).

При действии холерного токсина отмечено появление большого числа бокаловидных клеток (рис.24).

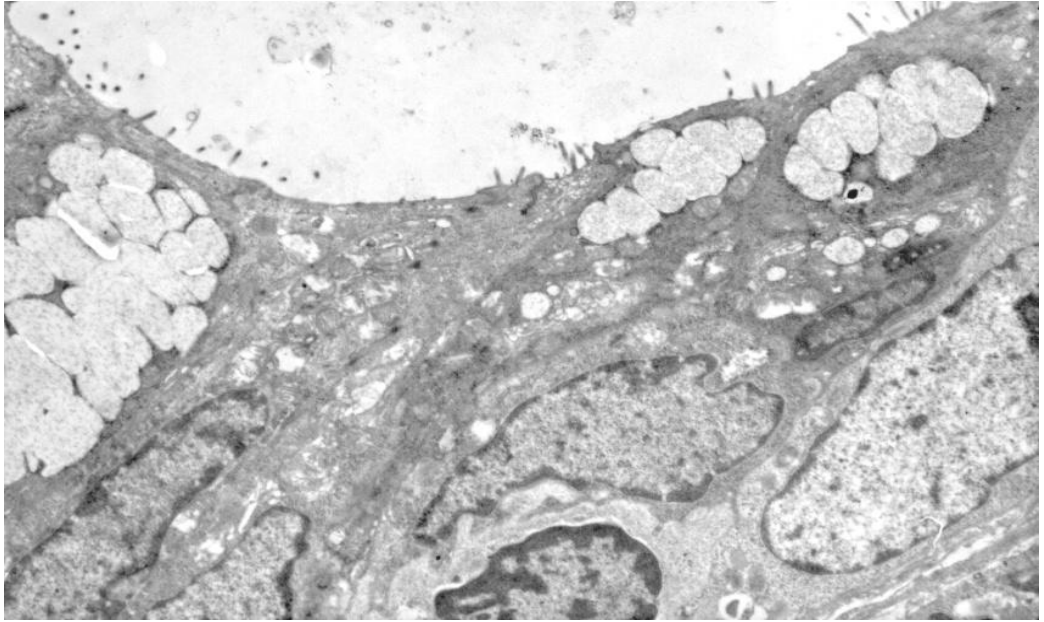
#### **4.3. Ультраструктура энтероцитов тощей кишки крысы при действии липополисахарида**

Плотные контакты не меняются, целостность эпителия сохранена при действии липополисахарида.

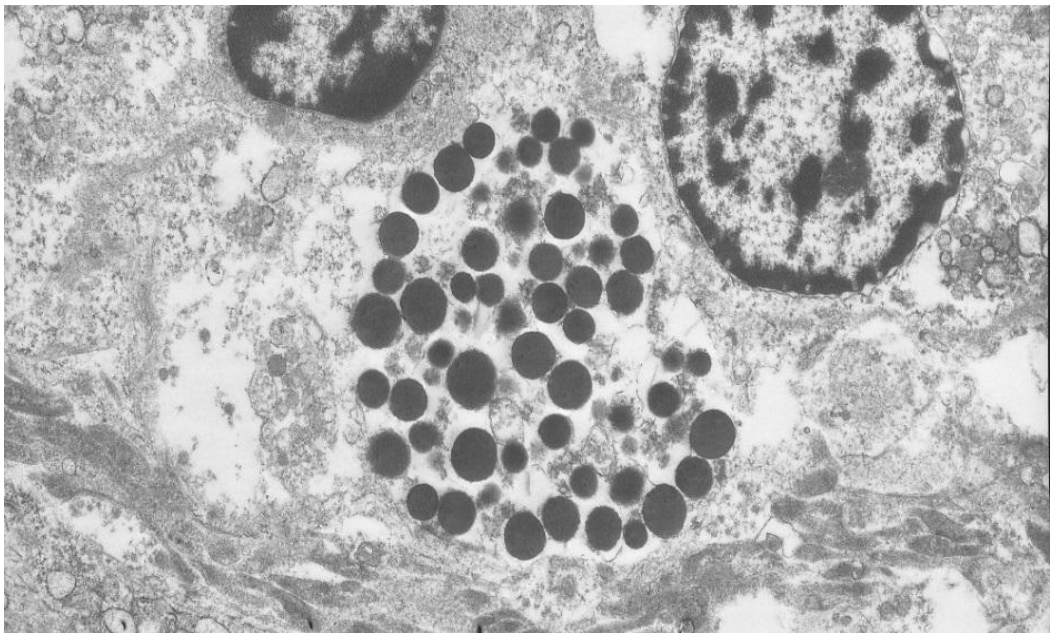
При воздействии липополисахарида в зоне, приближенной к апикальной поверхности энтероцитов, отмечали появление тучных клеток, заполненных гранулами (рис.25).

На большей части поверхности эпителия в проанализированных препаратах межклеточное пространство заметно не изменялось (рис.27). Площадь межклеточного пространства составила  $0,06 \pm 0,04 \text{ мкм}^2$  и достоверно не отличалась от контрольных значений ( $n=5$ ;  $p \leq 0,01$ ; U-критерий Манна-Уитни) (рис.28). При этом граница между отдельными клетками становилась более заметной.

Количество микроворсинок на апикальной поверхности клеток при применении липополисахарида существенно не отличалась от контрольных препаратов. Было отмечено увеличение количества митохондрий в клетках, как и в случае действия холерного токсина (рис.28).



*Рис 24 Ультратонкий срез энтероцитов тощей кишки крысы при действии холерного токсина, появление бокаловидных клеток. 1мкм*



*Рис.25. Ультратонкий срез фрагмента тучной клетки тощей кишки крысы при действии ЛПС.2 мкм*

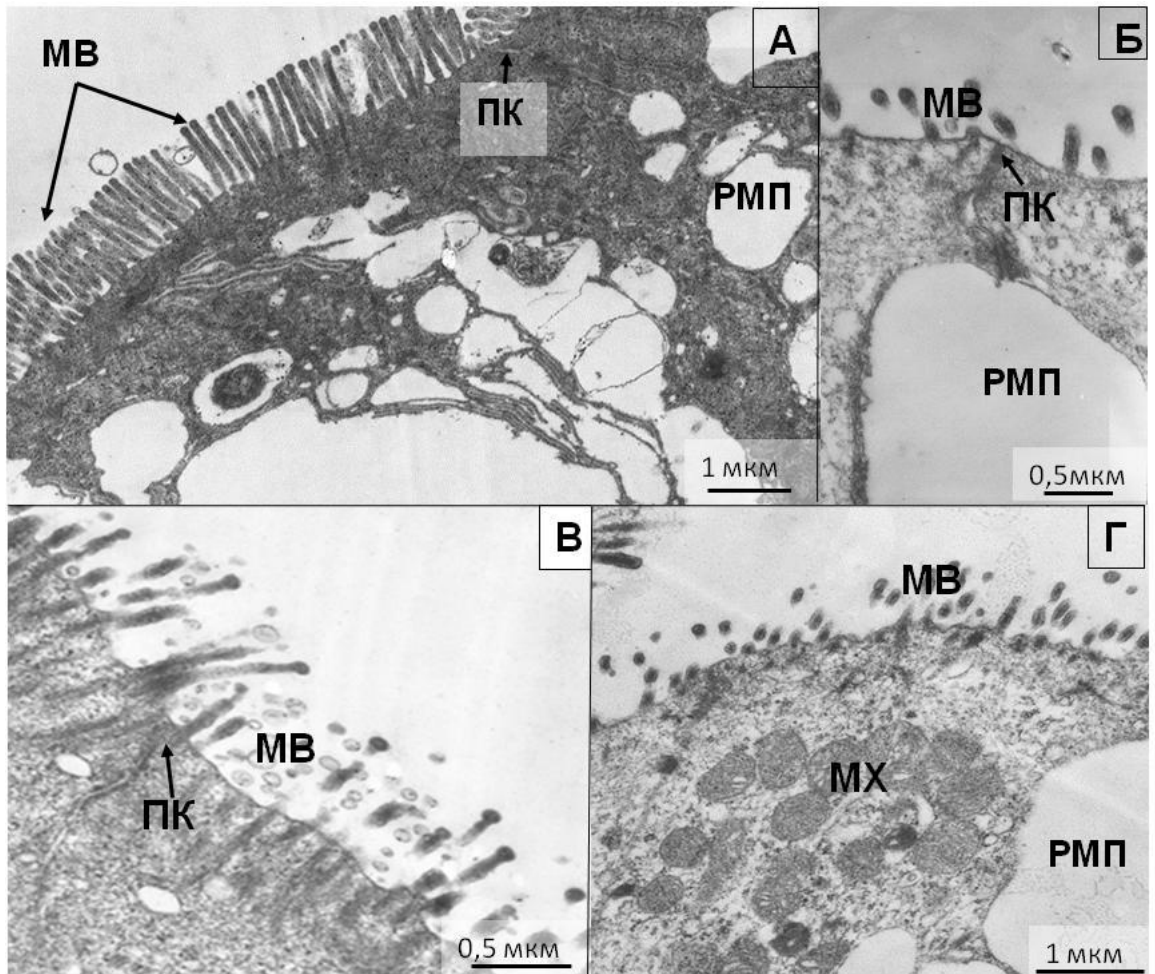
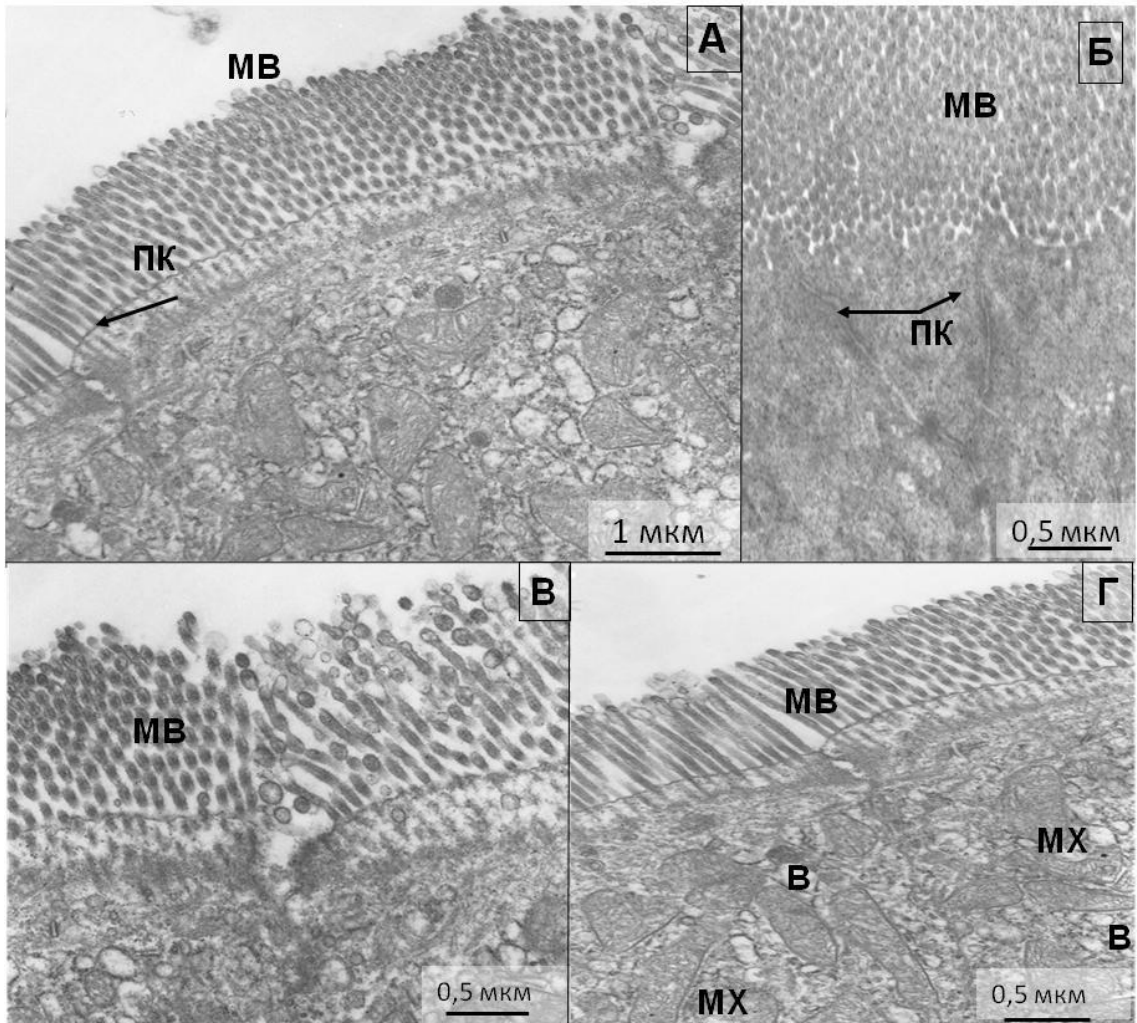


Рис.26. Ультратонкий срез энтероцитов тощей кишки крысы при действии холерного токсина. MB-микроворсинки, МХ-митохондрии, ПК-плотные контакты, РМП-расширенное межклеточное пространство.



*Рис.27. Ультратонкий срез энтероцитов тощей кишки крысы при действии липополисахарида. MB-микроворсинки, МХ-митохондрии, ПК-плотные контакты, В-везикулы.*



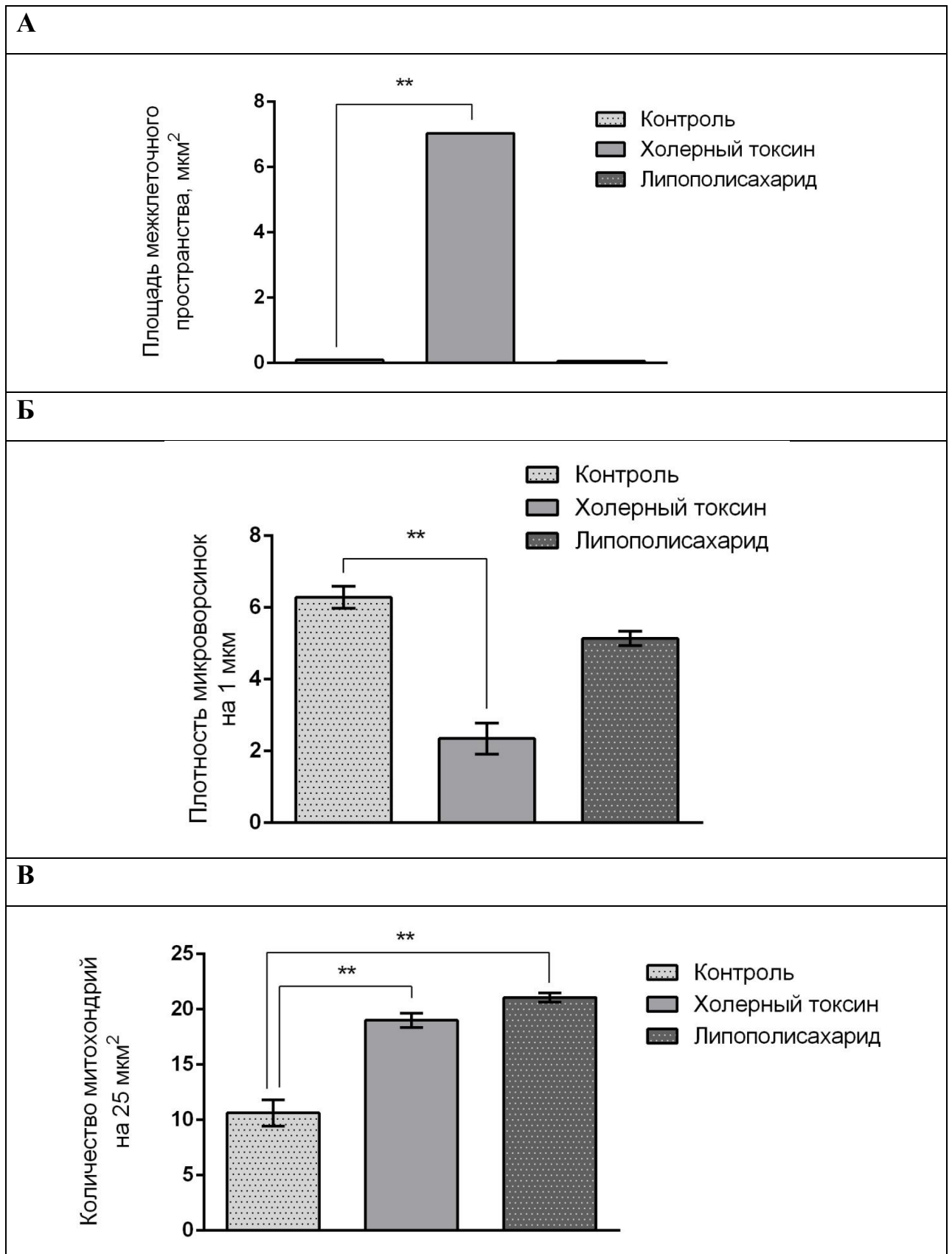


Рис.28. Изменение площади межклеточного пространства, плотности микроворсинок и количества митохондрий при действии холерного токсина и липополисахарида; \* $p < 0,01$  относительно контроля.

## ГЛАВА 5. ИЗМЕНЕНИЕ УРОВНЯ КЛАУДИНОВ В ЭПИТЕЛИИ ТОЩЕЙ КИШКИ И В ЛИНИИ КЛЕТОК IPES-J2 ПОД ДЕЙСТВИЕМ ХОЛЕРНОГО ТОКСИНА И ЛИПОПОЛИСАХАРИДА

### **5.1. 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 были 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.29, рис.30А). Полученные результаты согласуются с представлениями о действии холерного токсина, как потенциального агента, повышающего проницаемость эпителия.

При применении липополисахарида было отмечено увеличение уровня сигнала клаудина-2 и при этом увеличение сигнала клаудина-4 ( $n=3$ ;  $p<0,01$ ; U-критерий Манна-Уитни) (рис.29, рис.30А).

**5.2. 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.29, рис.30Б).

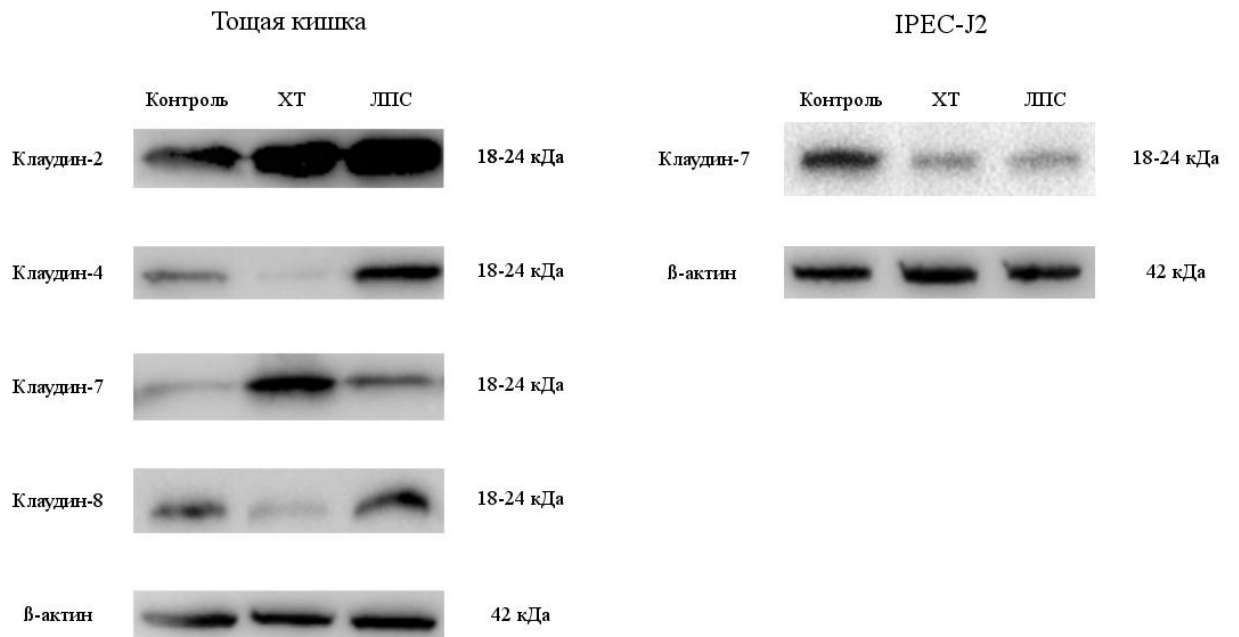


Рис. 29. Оригинальные изображения Вестерн-блот белков клаудинов-2,-4,-7,-8 и β-актина в тощей кишке и в линии клеток IPEC-J2. ХТ- холерный токсин, ЛПС- липополисахарид.

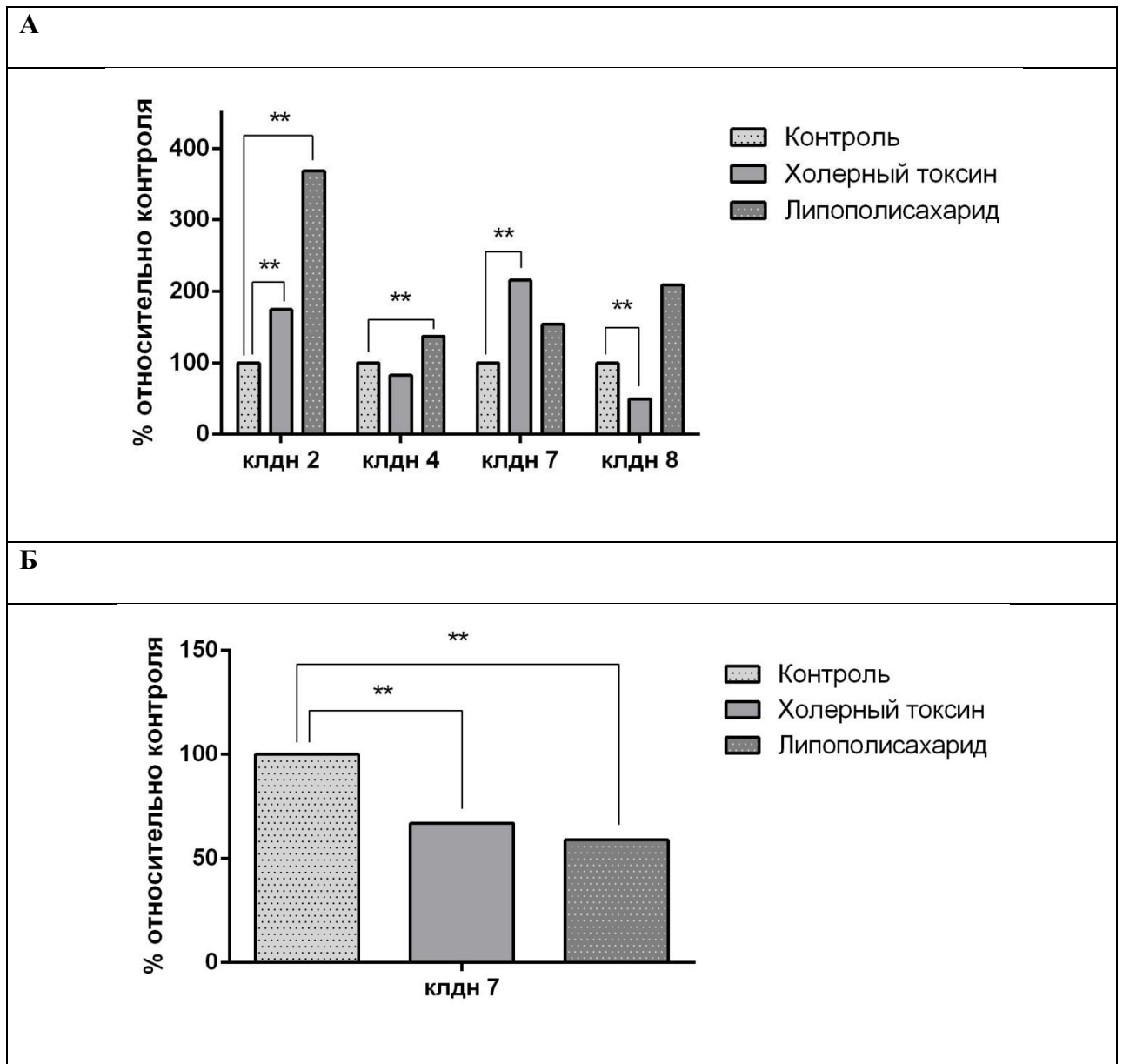


Рис. 30. Изменение уровня клаудинов в эпителии тощей кишки и в линии клеток IPEC-J2 при действии холерного токсина и липополисахарида. По оси ординат — относительное изменение уровня белков, %. По оси абсцисс — исследуемые клаудины; \* $p < 0,01$  относительно контроля.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ механизмов регуляции парацеллюлярного транспорта напрямую связан с исследованием барьерных свойств эпителия, определяемых комплексом белков плотных контактов, которые расположены 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. Последовательное увеличение активности аденилатциклазы, повышение уровня цАМФ и изменение функционирования отдельных белков-транспортеров, в частности, усиление секреции хлора через апикальные CFTR каналы, является характерным явлением при диарее, вызванной холерным токсином (Gabriel et al., 1994). В проведенных опытах холерный токсин вызывал снижение абсолютной величины трансэпителиального сопротивления эпителия кишки и его относительной величины по сравнению с контрольными образцами ткани к 90-й минуте инкубации. Следует отметить, что известно увеличение тока ионов хлора через эпителиальные клетки к 60-й минуте опыта регистрируется при создании определенных

экспериментальных условий – пермеабиллизации базолатеральной мембраны с помощью нистатина и создания значительного градиента ионов хлора между апикальной и базальной сторонами эпителия (Alzamora et al., 2011). Действие холерного токсина на нативную ткань имеет более медленные динамические характеристики в изменении электрофизиологических показателей ткани кишки (Markov et al., 2014). Фармакологический анализ с помощью блокатора транспортера  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$  буметанида показал, что в базо-латеральной мембране происходит транспорт ионов хлора в цитоплазму клетки. Применение теофиллина, известного как индуктора секреции ионов хлора в секреторных клетках через CFTR каналы (Köckerling et al., 1993; Kroesen et al., 2002) также подтверждает активность молекулярных компонентов для транспорта ионов хлора в проведенных экспериментах.

В целом стоит отметить сходную направленность изменения величины трансэпителиального сопротивления в его абсолютных и относительных величинах для эпителия ткани – снижение трансэпителиального сопротивления, то есть повышение проницаемости исследуемой структуры. Снижение трансэпителиального сопротивления в контроле относительно начального значения на ткани тощей кишки крысы, происходят, поскольку во всех экспериментах в работе использован физиологический раствор с глюкозой. В апикальной поверхности эпителиальных клеток работает транспортер SGLT-1, который осуществляет односторонний транспорт натрия и глюкозы (Drozdowski et al., 2006). В базолатеральной части клетки находится  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  АТФ-аза, которая выкачивает натрий из клетки и мембранный транспортер глюкозы GLUT-2. В экспериментах на клетках такого не наблюдается, хотя был использован аналогичный раствор. Возможно, это связано с наличием различных транспортных систем тощей кишки по сравнению с монослоем клеток.

В соответствии с изменением электрофизиологической оценки проницаемости были получены данные по межклеточной диффузии флуоресцеина натрия. Действие холерного токсина на эпителий тощей кишки

вызывало также увеличение диффузии флуоресцеина, свидетельствующего об увеличении прациеллюлярного транспорта в слизистой оболочке кишки. Таким образом, холерный токсин вызывал характерные для него снижение барьерных свойств эпителия тощей кишки крысы.

Применение холерного токсина в опытах с клетками линии IPEC-J2 не изменило абсолютных значения трансэпителиального сопротивления. Тем не менее, при сравнении относительных значений этого параметра было установлено, что после трех часов воздействия холерного токсина на клетки было отмечено снижение трансэпителиального сопротивления относительно контроля. Возможно, причина различий в действии холерного токсина на ткань и клетки линии IPEC-J2 связано с различным набором транспортеров и каналов в плазматической мембране клеток, в частности каналов для транспорта ионов хлора (CFTR). Однако, Zhu с соавтр (2017) установили, что не только эпителий тощей кишки поросенка, но и клетки IPEC-J2 экспрессируют матричную РНК этих каналов. В тоже время энтеротоксин *Escherichia coli* K88, вызывающий секреторную диарею также как и холерный токсин путем увеличения экспрессии каналов CFTR, увеличивает уровень мРНК этих каналов в эпителии тощей кишки крысы, но не оказывает такого действия в клетках линии IPEC-J2 (Zhu et al., 2017). Следовательно, различные энтеротоксины, вызывающие сходный физиологический эффект (диарея) и реализующие свой эффект через активацию одного и того же ионного канала (CFTR), действуют на ткань кишки, но не вызывают аналогичного эффекта в линии клеток IPEC-J2. Стоит обратить внимание на еще одно различие в свойствах этих объектов, то есть эпителии кишки и линии клеток IPEC-J2. Трансэпителиальное сопротивление эпителия тощей кишки свиньи составляет  $28 \pm 5 \text{ Ом} \cdot \text{см}^2$  (Zakrewski et al., 2013). Линия клеток IPEC-J2 происходит из эпителия тощей кишки поросенка, однако, имеет существенное отличие в величине трансэпителиального сопротивления в сравнении с эпителием тощей кишки. Монослой этих клеток может достигать величины более  $1000 \text{ Ом} \cdot \text{см}^2$  (Zakrewski et al., 2013).

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. К особому влиянию липополисахарида следует отнести увеличение численности тучных клеток, значительную роль в дегрануляции которых играет цАМФ. Известно, что на многие воздействия, в том числе на микробные токсины и фрагменты клеток бактерий, тучные клетки отвечают стереотипной реакцией - увеличением количества клеток и выбросом медиаторов из гранул. К особенностям воздействия холерогена на эпителиоциты слизистой оболочки тощей кишки можно отнести исчезновение складчатости латеральной области плазматической мембраны клеток и сокращение числа микроворсинок. Особое влияние холерогена следует отметить на бокаловидные клетки слизистой оболочки кишки, численность которых при его воздействии значительно увеличивалась.

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-J2 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 ИРЕС-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 ИРЕС-J2 вызывал снижение уровня клаудина-7.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Адамс Р. Методы культуры клеток для биохимиков - М.: Мир. 2001. 263 с.
2. Афиногенова А.Г. Влияние бигуанидов на формирование стрептококковой биопленки на модели культуры клеток фибробластов кожи эмбриона человека / Афиногенова А.Г., Грабовская К.Б., Кулешевич Е.В., Суворов А.Н., Афиногенов Г.Е. // Инфекции в хирургии. 2011. том 9, №1. - С.5-13.
3. Бондаренко В.М., Рябиченко Е.В. Роль транслокации кишечной бактериальной аутофлоры и ее токсических биомолекул в патологии человека// Эксперим.клин.гастроэнтерол.2007. №5, - с.86-92.
4. Бондаренко В. Микрофлора человека: норма и патология.// "Наука в России". 2007. № 1.
5. Бондаренко В.М. Молекулярно-клеточные механизмы терапевтического действия пробиотических препаратов// Фарматека.2010. № 2:26-32.
6. Бондаренко В.М., Рябиченко Е.В. Роль дисфункции кишечного барьера в поддержании хронического воспалительного процесса различной локализации// Журн. Микробиол.2010. 1: 92 — 100.
7. Бондаренко В.М, Лиходед В.Г. Распознавание комменсальной микрофлоры образраспознающими рецепторами в физиологии и патологии человека// Журн микробиол.2012.. 3:82-89.
8. Громова Л.В., Борщев Ю.Ю., Ермоленко Е.И., Грефнер Н.М., Алексеева А.С., Воейкова А.В., Груздков А.А. Действие антимикробных препаратов на кишечные пищеварительные ферменты у крыс // Вестник Санкт–Петербургского Университета.2012. Серия 11, вып.3.– С. 161 – 170.
9. Ермоленко Е.И., Донец В.Н., Дмитриева Ю.В., Ильясов Ю.Ю. Влияние пробиотических энтерококков на функциональные характеристики кишечника крыс при дисбиозе, индуцированном антибиотиками // Вестник

СПбГУ. Серия 11 Медицина. 2009. Т. 1. 157-167.

10. Каралова Е. М. Клетки аденокарциномы толстого отдела кишечника человека CaCo-2 в процессе культивирования// Цитология. 2006.Т. 48, N 4: 315-319.

11. Марков А.Г., Amasheh S. Изменение электрофизиологических параметров и распределения белков плотных контактов вдоль продольной оси кишки крысы// Российский Физиологический журнал им. И. М. Сеченова. 2011.Т. 97, N 10: 1066-1083.

12. Ноздрачев А. Д., Поляков Е. Л. Анатомия крысы (Лабораторные животные) / Под ред. академика А. Д. Ноздрачева. — СПб.: Издательство «Лань».2001.464 с.

13. Рыбальченко О.В. Электронно-микроскопическое исследование межклеточных взаимодействий микроорганизмов при антагонистическом характере взаимоотношений// Микробиология. 2006.75(4):550-555.

14. Рябиченко Е.В., Веткова Л.Г., Бондаренко В.М. Молекулярные аспекты повреждающего действия бактериальных липополисахаридов// Журн. микробиол. 2004. 3:98-105.

15. Тимофеева Н.М., Иезуитова Н.Н., Громова Л.В. Современные представления о всасывании моносахаридов, аминокислот, пептидов в тонкой кишке млекопитающих// Успехи физиол. наук.2000. Т.31 (4) :24-37.

16. Уголев А.М., Гусев В.М., Груздков А.А. Транссорбция как важный механизм молекулярного транспорта в биологических системах// Физиол. ж. 1992. 78(8):38-43.

17. Хендерсон Д.М. Патофизиология органов пищеварения // М.: Бином. 2005. - с. 79–97.

18. Шпаков А.О., Гурьянов И.А., Кузнецова Л.А., Плесева С.А., Захарова Е. Т., Власов Г. П., Перцева М. Н.. Сравнительное исследование молекулярных механизмов влияния природных и синтетических поликатионных пептидов на активность аденилатциклазной сигнальной системы// Цитология. 2006.48 (5):450-9.

19. Alavi N, Lianos E, Andres G, Bentzel CJ. Effect of protamine on the permeability and structure of rat peritoneum// *Kidney Int.* 1982.21(1):44-53.
20. Alexandre M.D., Lu Q., Chen Y.H. Overexpression of claudin-7 decreases the paracellular Cl<sup>-</sup> conductance and increases the paracellular Na<sup>+</sup> conductance in LLC-PK1 cells// *J. Cell Sci.* 2005. 118 : 2683–2693.
21. Alzamora SM., Guerrero SN., Schenk M., Raffellini S., Lopez-Male A. Inactivation of microorganisms// Springer, New York. 2011. p 321-343.
22. Amasheh S., Meiri N., Gitter A.H. et al. Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells// *J. Cell Sci.* 2002.115 : 4969-4976.
23. Amasheh M., Schlichter S., Amasheh S. Quercetin enhances epithelial barrier function and increases claudin-4 expression in Caco-2 cells// *J Nutr.* 2008.138(6) :1067-1073.
24. Amasheh S., Milatz S., Krug S.M. Na<sup>+</sup> absorption defends from paracellular back-leakage by claudin-8 upregulation// *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 2008.
25. Amasheh S, Milatz S, Krug SM, Markov AG, Günzel D, Amasheh M, Fromm M (2009) Tight junction proteins as channel formers and barrier builders: claudin-2, -5, and -8// *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2009. 1165: 211-219.
26. Angelow S., El-Husseini R., Kanzawa S.A., Yu A.S. Renal localization and function of the tight junction protein, claudin-19// *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007.293 : 66-77.
27. Anderson JM. Molecular structure of tight junctions and their role in epithelial transport// *News Physiol Sci.* 2001.16:126-30.
28. Ando-Akatsuka Y, Saitou M, Hirase T, Kishi M, Sakakibara A, Itoh M, Yonemura S, Furuse M, Tsukita S. Interspecies diversity of the occludin sequence: cDNA cloning of human, mouse, dog, and rat-kangaroo homologues// *J Cell Biol.* 1996. 133(1):43-7.
29. Balda MS, Whitney JA, Flores C, González S, Cereijido M, Matter K. Functional dissociation of paracellular permeability and transepithelial electrical

resistance and disruption of the apical-basolateral intramembrane diffusion barrier by expression of a mutant tight junction membrane protein// *J Cell Biol.* 1996.134(4):1031-49.

30. Bamforth SD, Kniesel U, Wolburg H, Engelhardt B, Risau W. A dominant mutant of occludin disrupts tight junction structure and function// *J Cell Sci.*1999.112 ( Pt 12):1879-88.

31. Bazzoni G, Martinez-Estrada OM, Orsenigo F, Cordenonsi M, Citi S, Dejana E. Interaction of junctional adhesion molecule with the tight junction components ZO-1, cingulin, and occluding// *J Biol Chem.* 2000.7;275(27):20520-6.

32. Bentzel CJ, Fromm M, Palant CE, Hegel U. Protamine alters structure and conductance of *Necturus* gallbladder tight junctions without major electrical effects on the apical cell membrane// *J Membr Biol.* 1987. 95(1):9-20.

33. Berkes J, Viswanathan VK, Savkovic SD, Hecht G. Intestinal epithelial responses to enteric pathogens: effects on the tight junction barrier, ion transport, and inflammation// *Gut.* 2003.52(3):439-51.

34. Berschneider HM. Development of normal cultured small intestinal epithelial cell lines which transport Na and Cl// *Gastroenterology* 1988. 96:A41.

35. Bjerknes M., Cheng H. The stem-cell zone of the small intestinal epithelium. I. Evidence from Paneth cells in the adult mouse. *Am J Anat.*160 :51-63. 1981.

36. Breitwieser GE, Miedlich SU, Zhang M. Calcium sensing receptors as integrators of multiple metabolic signals// *Cell Calcium.*2004. Mar;35(3):209-16.

37. Brosnahan AJ, Brown DR. Porcine IPEC-J2 intestinal epithelial cells in microbiological investigations// *Vet Microbiol.* 2012. 156(3-4):229-37.

38. Brot-Laroche E., Tobin V., Klein. C. et al. Insulin controls the location of GLUT2 in the brush border membrane of enterocytes // *J. Physiol. Biochem.* 2007. 63 (1): 9.

39. Burant C.F., Takeda J., Brot-Laroche E. Fructose transporter in human spermatozoa and small intestine is GLUT// *J. Biol. Chem.*1992. 267 : 14527-14526.
40. Cereijido M., Contreras R.G., Shoshani L. Cell Adhesion, Polarity, and Epithelia in the Dawn of Metazoans// *Physiol Rev.*2004. 84 : 1229-1269.
41. Cheng H., Merzel J., Leblond C.P. Renewal of Paneth cells in the small intestine of the mouse// *Am. J. Anat.*1969. 126 : 507-525.
42. Chiba H., Osanai M., Murata M. Transmembrane proteins of tight junctions// *Biochimica et Biophysica Acta.*2008. 1778 : 588–600.
43. Choudhury A, Dominguez M, Puri V, Sharma DK, Narita K, Wheatley CL, Marks DL, Pagano RE. Rab proteins mediate Golgi transport of caveola-internalized glycosphingolipids and correct lipid trafficking in Niemann-Pick C cells// *J Clin Invest.*2002. 109(12):1541-50.
44. Colegio O.R., Van Itallie C., Rahner C. et al. Claudin extracellular domains determine paracellular charge selectivity and resistance but not tight junction fibril architecture// *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*2003. 284 : 1346-1354.
45. Contreras R.G., Shoshani L., Flores-Maldonado C. E-cadherin and tight junctions between epithelial cells of different animal species// *Pflügers Archiv.* 2002.444 (4) :467-475.
46. Crawford I, Maloney PC, Zeitlin PL, Guggino WB, Hyde SC, Turley H, Gatter KC, Harris A, Higgins CF. Immunocytochemical localization of the cystic fibrosis gene product CFTR// *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991 15;88(20):9262-6.
47. Cuatrecasas P. Gangliosides and membrane receptors for cholera toxin// *Biochemistry.* 1973. 28;12(18):3558-66.
48. De Haan L, Hirst TR. Cholera toxin: a paradigm for multi-functional engagement of cellular mechanisms (Review)// *Mol Membr Biol.*2004. 21(2):77-92.
49. Drozdowski L.A., Thomson A.B. Intestinal sugar transport// *World J. Gastroenterol.* 2006.12(11) : 1657-1670.

50. Duffey ME, Hainau B, Ho S, Bentzel CJ. Regulation of epithelial tight junction permeability by cyclic AMP// *Nature*.1981. 3;294(5840):451-3.
51. Escaffit F., Boudreau F., Beaulieu J.F. et al. Differential expression of claudin-2 along the human intestine: Implication of GATA-4 in the maintenance of claudin-2 in differentiating cells// *J Cell Physiol*. 2005. 203(1) :15-26.
52. Farquhar MG, Palade GE. Junctional complexes in various epithelia// *J Cell Biol*. 1963.17:375-412.
53. Feldman GJ, Mullin JM, Ryan MP. Occludin: structure, function and regulation// *Adv Drug Deliv Rev*.2005. 57(6):883-917.
54. Feng S.Y., Samarasinghe T., Phillips D.J. et al. Acute and chronic effects of endotoxin on cerebral circulation in lambs// *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol*. 2010. 298(3): 760-766. 48.
55. Fink M.P., Mythen M.G. The role of gut-derived endotoxin in the pathogenesis of multiple organ dysfunction// Dekker, New York. 1999. pp855-864.
56. Freeman HJ. Crypt region localization of intestinal stem cells in adults// *World J Gastroenterol*.2008. 14(47) :7160-7162.
57. Fromm M, Palant CE, Bentzel CJ, Hegel U. Protamine reversibly decreases paracellular cation permeability in *Necturus* gallbladder// *J Membr Biol*. 1985 87(2):141-50.
58. Fromm M, Tykocinski M, Schulzke JD, Hegel U, Bentzel CJ. pH dependence of protamine action on apical membrane permeability in *Necturus* gallbladder epithelium// *Biochim Biophys Acta*.1990. 1027(2):179-84.
59. Fujita H., Sugimoto K., Inatomi S. Tight junction proteins claudin-2 and -12 are critical for vitamin D-dependent Ca<sup>2+</sup> absorption between enterocytes// *Mol Biol Cell*. 2008.19(5) :1912-1921.
60. Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S, Tsukita S. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions// *J Cell Biol*.1993.123(6 Pt 2):1777-88.
61. Furuse M, Itoh M, Hirase T, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S, Tsukita S. Direct association of occludin with ZO-1 and its possible involvement



in the localization of occludin at tight junctions// *J Cell Biol.*1994. 127(6 Pt 1):1617-26.

62. Furuse M., Sasaki H., Fujimoto K. et al. S. A single gene product, claudin-1 or -2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts// *J. Cell Biol.*1998. 143 :391-401.

63. Furuse M, Fujita K, Hiiragi T, Fujimoto K, Tsukita S. Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occluding// *J Cell Biol.* 1998. 141(7):1539-50.

64. Furuse M., Sasaki H., Tsukita S. Manner of interaction of heterogeneous claudin species within and between tight junction strands// *J. Cell Biol.*1999. 147 (4) : 891-903.

65. Furuse M., Tsukita S. Claudins in occluding junctions of humans and flies// *Trends Cell Biol.*2006. 16 :181–188.

66. Gabriel SE., Brigman KN., Koller BH., Boucher RC., Stutts MJ. Cystic fibrosis heterozygote resistance to cholera toxin in the cystic fibrosis mouse model// *Science*,1994.

67. Gama L, Baxendale-Cox LM, Breitwieser GE. Ca<sup>2+</sup>-sensing receptors in intestinal epithelium// *Am J Physiol.* 1997. 273(4 Pt 1):C1168-75.

68. Gebert A., Rothkötter H.J., Pabst R. M cells in Peyer's patches of the intestine// *Int Rev Cytol.*1996. 167 :91-159.

69. Gorraitz E., Garces A., Errasti-Murugarren E. et al. Comparison of nucleosides transport by HCNT3 in the presence of Na<sup>+</sup> or H<sup>+</sup> // *J. Physiol. Biochem.* 2007. 63 (1) :30.

70. Gstraunthaler G, Steinmassl D, Pfaller W. Renal cell cultures: a tool for studying tubular function and nephrotoxicity// *Toxicol Lett.* 1990.53(1-2):1-7.

71. Guillemot L, Paschoud S, Pulimeno P, Foglia A, Citi S. The cytoplasmic plaque of tight junctions: a scaffolding and signalling center// *Biochim Biophys Acta.*2008. 1778(3):601-13.

72. Günzel, D., and Fromm, M. Claudins and Other Tight Junction Proteins // *Compr. Physiol.*2012. V. 2. 1819–1852.

73. Handler JS, Perkins FM, Johnson JP. Studies of renal cell function using cell culture techniques// *Am J Physiol.*1980. 238(1):F1-9.
74. Haskins J, Gu L, Wittchen ES, Hibbard J, Stevenson BR. ZO-3, a novel member of the MAGUK protein family found at the tight junction, interacts with ZO-1 and occluding// *J Cell Biol.*1998. 141(1):199-208.
75. Hazes B, Read RJ. Accumulating evidence suggests that several AB-toxins subvert the endoplasmic reticulum-associated protein degradation pathway to enter target cells// *Biochemistry.*1997. 36(37):11051-4.
76. Hein M, Madefessel C, Haag B, Teichmann K, Post A, Galla HJ. Implications of a non-lamellar lipid phase for the tight junction stability. Part II: Reversible modulation of transepithelial resistance in high and low resistance MDCK-cells by basic amino acids, Ca<sup>2+</sup>, protamine and protons// *Chem Phys Lipids.*1992. 63(3):223-33.
77. Hernandez S, Chavez Munguia B, Gonzalez-Mariscal L. ZO-2 silencing in epithelial cells perturbs the gate and fence function of tight junctions and leads to an atypical monolayer architecture// *Exp Cell Res.*2007. 313(8):1533-47.
78. Horrow JC. Protamine: a review of its toxicity// *Anesth Analg*1985.. 64(3):348-61.
79. Hou J., Paul D.L., Goodenough D.A. Paracellin-1 and the modulation of ion selectivity of tight junctions// *J Cell Sci.*2005. 1;118(Pt 21) :5109-5118.
80. Housley R.M., Morris C.F., Boyle W., Ring B., Biltz R., Tarpley J.E., Aukerman S.L., Devine P.L., Whitehead R.H., Pierce G.F. Keratinocyte growth factor induces proliferation of hepatocytes and epithelial cells throughout the rat gastrointestinal tract// *J Clin Invest.*1994. 94 :1764-77.
81. Hughes R., Kurth M. J., McGilligan V., McGlynn H., Rowland I. Effect of colonic bacterial metabolites on Caco-2 cell paracellular permeability in vitro// *Nutrition and Cancer.*2008. 60 (2) : 259–266.
82. Ikenouchi J., Furuse M., Furuse K., Sasaki H., Tsukita S., Tsukita S. Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells// *J. Cell Biol.*2005. 171 (6) : 939-945.

83. Ikenouchi J, Sasaki H, Tsukita S, Furuse M, Tsukita S. Loss of occludin affects tricellular localization of tricellulin// *Mol Biol Cell*.2008. 19(11):4687-93.
84. Itoh M, Furuse M, Morita K, Kubota K, Saitou M, Tsukita S. Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins// *J Cell Biol*.1999. 147(6):1351-63.
85. Jirmanová I, Libelius R, Lundquist I, Thesleff S. Protamine induced intracellular uptake of horseradish peroxidase and vacuolation in mouse skeletal muscle in vitro// *Cell Tissue Res*.1977. 176(4):463-73.
86. Kale G, Naren AP, Sheth P, Rao RK. Tyrosine phosphorylation of occludin attenuates its interactions with ZO-1, ZO-2, and ZO-3// *Biochem Biophys Res Commun*. 2003.302(2):324-9.
87. Katahira J, Inoue N, Horiguchi Y, Matsuda M, Sugimoto N. Molecular cloning and functional characterization of the receptor for *Clostridium perfringens* enterotoxin// *J Cell Biol*.1997. 136(6):1239-47.
88. Kausalya P.J., Amasheh S., Günzel D. Disease-associated mutations affect intracellular traffic and paracellular Mg<sup>2+</sup> transport function of claudin-16// *J. Clin. Invest*.2006. 116 :878–891.
89. Kerjaschki D. Polycation-induced dislocation of slit diaphragms and formation of cell junctions in rat kidney glomeruli: the effects of low temperature, divalent cations, colchicine, and cytochalasin // *Lab Invest*. 1978. 39(5):430-40.
90. Kernéis S., Bogdanova A., Kraehenbuhl J.P., Pringault E. Conversion by Peyer's patch lymphocytes of human enterocytes into M cells that transport bacteria// *Science*. 1997. 277 :949-52.
91. Kim Y.M., Romero R., Chaiworapongsa T. et al. Toll-like receptor-2 and -4 in the chorioamniotic membranes in spontaneous labor at term and in preterm parturition that are associated with chorioamnionitis// *Am. J. Obstet. Gynecol*.2004. 191(4): 1346-1355. 39.
92. Kim H.W., Lee A.J., You S. et al. Characterization of taurine as inhibitor of sodium glucose transporter// *Adv. Exp. Med. Biol*.2006. 583 :137-145.

93. Koyama S, Yoshitomi K, Imai M. Effect of protamine on ion conductance of upper portion of descending limb of long-looped nephron from hamsters// *Am J Physiol.* 1991. 260(6 Pt 2):F839-47.
94. Köckerling A, Fromm M. Origin of cAMP dependent Cl<sup>-</sup> secretion from both crypts and surface epithelia of rat intestine// *Am. J. Physiol.* 1993. 264: C1294-C1301.
95. Köckerling A, Sorgenfrei D, Fromm M. Electrogenic Na<sup>+</sup> absorption of rat distal colon is confined to surface epithelium. A voltage scanning study// *Am. J. Physiol.* 1993. 264: C1285-C1293.
96. Krause G, Winkler L, Mueller SL, Haseloff RF, Piontek J, Blasig IE. Structure and function of claudins// *Biochim Biophys Acta.* 2008. 1778(3):631-45.
97. Kreisberg JI, Wilson PD. Renal cell culture// *J Electron Microsc Tech.* 1988. 9(3):235-63.
98. Kroesen AJ, Stockmann M, Ransco C, Schulzke JD, Fromm M, Buhr HJ. Impairment of epithelial transport but not of barrier function in idiopathic pouchitis after ulcerative colitis// *Gut* 2002.50(6): 821-826.
99. Krug SM, Amasheh S, Richter JF, Milatz S, Günzel D, Westphal JK, Huber O, Schulzke JD, Fromm M. Tricellulin forms a barrier to macromolecules in tricellular tight junctions without affecting ion permeability// *Mol Biol Cell.* 2009. 20(16):3713-24.
100. Krug SM, Fromm M, Günzel D. Two-path impedance spectroscopy for measuring paracellular and transcellular epithelial resistance// *Biophys J.* 2009. 97(8):2202-11.
101. Kushak R.I., Winter H.S. Dietary carbohydrates: digestion and absorption/ *Trends in dietary fats research.* Ed. Landow M.V//Nova science Publishers Inc. 2005. 1-30.
102. Laboisse C., Jarry A., Branka J.E., Merlin D., Bou-Hanna C., Vallette G. Recent aspects of the regulation of intestinal mucus secretion// *Proc Nutr Soc.* 1996. 55 :259-64.

103. Lauer S, Goldstein B, Nolan RL, Nolan JP. Analysis of cholera toxin-ganglioside interactions by flow cytometry// *Biochemistry*.2002. 41(6):1742-51.
104. Laura RP, Ross S, Koeppen H, Lasky LA. MAGI-1: a widely expressed, alternatively spliced tight junction protein// *Exp Cell Res*.2002. 275(2):155-70.
105. Lavelle J, Meyers S, Ramage R, Bastacky S, Doty D, Apodaca G, Zeidel ML. Bladder permeability barrier: recovery from selective injury of surface epithelial cells// *Am J Physiol Renal Physiol*.2002. 283(2):F242-53.
106. Lentz T.L. *Cell Fine Structure*// Philadelphia: Saunders.1971. 306c.
107. Libelius R, Lundquist I. Lysosomal activation in mouse skeletal muscle induced by protamine in vitro// *Cell Tissue Res*.1978. 186(1):1-11.
108. Loo D.D., Wright E.M., Zeuthen T. Water Pumps// *J. Physiol*. 2002.542 (1) :53-60.
109. Madsen, K., Cornish, A., Soper, P., McKaigney, C., Jijon, H., Yachimec, C., Doyle, J., Jewell, L., and De Simone, C. Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function // *Gastroenterology*. 2001. V. 121. 580–591.
110. Magri E, Zaccarini M, Grazi E. The interaction of histone and protamine with actin. Possible involvement in the formation of the mitotic spindle// *Biochem Biophys Res Commun*.1978. 82(4):1207-10.
111. Mahraoui L, Rodolosse A, Barbat A, Dussaulx E, Zweibaum A, Rousset M, Brot-Laroche E. Presence and differential expression of SGLT1, GLUT1, GLUT2, GLUT3 and GLUT5 hexose-transporter mRNAs in Caco-2 cell clones in relation to cell growth and glucose consumption// *Biochem J*. 1994. 298 Pt 3:629-33.
112. Markov AG, Veshnyakova A, Fromm M, Amasheh M, Amasheh S. Segmental expression of claudin proteins correlates with tight junction barrier properties in rat intestine// *J Comp Physiol B*.2010. 180(4):591-8.
113. Markov, A.G., Falchuk, E.L., Kruglova, N.M., Rybalchenko, O. V., Fromm, M., and Amasheh, S. Comparative analysis of theophylline and cholera

toxin in rat colon reveals an induction of sealing tight junction proteins // Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol. 2014. V. 466. 2059–2065.

114. Markov AG, Falchuk EL, Kruglova NM, Radloff J, Amasheh S. Claudin expression in follicle-associated epithelium of rat Peyer's patches defines a major restriction of the paracellular pathway// Acta Physiol (Oxf). 2016. 216(1):112-9.

115. Martin-Padura I, Lostaglio S, Schneemann M, Williams L, Romano M, Fruscella P, Panzeri C, Stoppacciaro A, Ruco L, Villa A, Simmons D, Dejana E. Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration// J Cell Biol. 1998. 142(1):117-27.

116. Matter K, Aijaz S, Tsapara A, Balda MS. Mammalian tight junctions in the regulation of epithelial differentiation and proliferation// Curr Opin Cell Biol. 2005. 17(5):453-8.

117. McCarthy KM, Francis SA, McCormack JM, Lai J, Rogers RA, Skare IB, Lynch RD, Schneeberger EE. Inducible expression of claudin-1-myc but not occludin-VSV-G results in aberrant tight junction strand formation in MDCK cells// J Cell Sci. 2000. 113 Pt 19:3387-98.

118. McNeil E, Capaldo CT, Macara IG. Zonula occludens-1 function in the assembly of tight junctions in Madin-Darby canine kidney epithelial cells// Mol Biol Cell. 2006. 17(4):1922-3.

119. Medina R, Rahner C, Mitic LL, Anderson JM, Van Itallie CM. Occludin localization at the tight junction requires the second extracellular loop// J Membr Biol. 2000. 178(3):235-47.

120. Mikawa S, Ohta Y, Kaji N, Islam Md S, Murata N, Ozaki H and Hori M. Time-dependent changes in inhibitory action of lipopolysaccharide on intestinal motility in rat// J. Vet. Med. Sci. 2015. 77(11): 1443–1449.

121. Mineta K, Yamamoto Y, Yamazaki Y, Tanaka H, Tada Y, Saito K, Tamura A, Igarashi M, Endo T, Takeuchi K, Tsukita S. Predicted expansion of the claudin multigene family// FEBS Lett. 2011. 585(4):606-12.

122. Münch A., Ström M., Söderholm J. Dihydroxy bile acids increase mucosal permeability and bacterial uptake in human colon biopsies. *Scandinavian J. Gastroenterology*. 2007. 42: 1167-1174.
123. Nishimura M, Kakizaki M, Ono Y, Morimoto K, Takeuchi M, Inoue Y, Imai T, Takai Y. JEAP, a novel component of tight junctions in exocrine cells// *J Biol Chem*. 2002. 277(7):5583-7.
124. Nitta T., Hata M., Gotoh S. Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice// *J. Cell Biol*. 2003. 161 :653–660.
125. Pappenheimer J.R. Role of pre-epithelial “unstirred” layers in absorption of nutrients from the human jejunum// *J. Membr. Biol*. 2001. 179(2) :185-204.
126. Peixoto EB, Collares-Buzato CB. Protamine-induced epithelial barrier disruption involves rearrangement of cytoskeleton and decreased tight junction-associated protein expression in cultured MDCK strains// *Cell Struct Funct*. 2005. 29(5-6):165-78.
127. Peng L., Li ZR., Green RS., Holzman IR., Lin J. Butyrate enhances the intestinal barrier by facilitating tight junction assembly via activation of AMP-activated protein kinase in Caco-2 cell monolayers// *J Nutr*. 2009.139(9):1619-25.
128. Perkins H.A., Osborne J.J., Hurt R., Gerbode F. Neutralization of heparin in vivo with protamine: a simple method of estimating the required dose// *J Lab Clin Med*. 1956. 48(2):223-6.
129. Peterson MW, Gruenhaupt D. Protamine increases the permeability of cultured epithelial monolayers// *J Appl Physiol*. 1990. 68(1):220-7.
130. Peterson MW, Gruenhaupt D. Protamine interaction with the epithelial cell surface// *J Appl Physiol*. 1992. 72(1):236-41.
131. Poler SM, Reuss L. Protamine alters apical membrane K<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> permeability in gallbladder epithelium// *Am J Physiol*. 1987. 253(5 Pt 1):C662-71.
132. Powel D.W., Mifflin R.C., Valentich J.D., Crowe S.E., Saada J.I., West A.B. Myofibroblasts.II.Intestinal subepithelial myofibroblasts// *Am J Physiol*. 1999. 277 :183-201.

133. Quinton PM, Philpott CW. A role for anionic sites in epithelial architecture. Effects of cationic polymers on cell membrane structure// *J Cell Biol.*1973. 56(3):787-96.
134. Rao R. Occludin phosphorylation in regulation of epithelial tight junctions// *Ann N Y Acad Sci.* 2009. 1165:62-8.
135. Raschperger E, Engstrom U, Pettersson RF, Fuxe J. CLMP, a novel member of the CTX family and a new component of epithelial tight junctions// *J Biol Chem.* 2004. 279(1):796-804.
136. Riazuddin S, Ahmed ZM, Fanning AS, Lagziel A, Kitajiri S, Ramzan K, Khan SN, Chattaraj P, Friedman PL, Anderson JM, Belyantseva IA, Forge A, Riazuddin S, Friedman TB. Tricellulin is a tight-junction protein necessary for hearing// *Am J Hum Genet.* 2006. 279(6):1040-51.
137. Roux W. *Gesammelte Abhandlungen über Entwicklungsmechanik.* 1895. 1-328.
138. Rüdiger F, Greger R, Nitschke R, Henger A, Mundel P, Pavenstädt H. Polycations induce calcium signaling in glomerular podocytes// *Kidney Int.* 1999. 56(5):1700-9.
139. Sack DA, Sack RB, Nair GB, Siddique AK. Cholera// *Lancet.* 2004. 363(9404):223-33.
140. Saitou M, Ando-Akatsuka Y, Itoh M, Furuse M, Inazawa J, Fujimoto K, Tsukita S. Mammalian occludin in epithelial cells: its expression and subcellular distribution// *Eur J Cell Biol.*1997. 73(3):222-31.
141. Saitou M, Fujimoto K, Doi Y, Itoh M, Fujimoto T, Furuse M, Takano H, Noda T, Tsukita S. Occludin-deficient embryonic stem cells can differentiate into polarized epithelial cells bearing tight junctions// *J Cell Biol.*1998. 141(2):397-408.
142. Sakakibara A, Furuse M, Saitou M, Ando-Akatsuka Y, Tsukita S. Possible involvement of phosphorylation of occludin in tight junction formation// *J Cell Biol.* 1997. 137(6):1393-401.



143. Sato K, Ullrich KJ. Mechanism of inhibition of the proximal tubular isotonic fluid absorption by polylysine and other cationic polyamino acids// *J Membr Biol.* 1975.21(3-4):311-34.
144. Schierack P, Nordhoff M, Pollmann M, Weyrauch KD, Amasheh S, Lodemann U, Jores J, Tachu B, Kleta S, Blikslager A, Tedin K, Wieler LH. Characterization of a porcine intestinal epithelial cell line for in vitro studies of microbial pathogenesis in swine// *Histochem Cell Biol.* 2006.125(3):293-305.
145. Schulzke JD, Gitter AH, Mankertz J, Spiegel S, Seidler U, Amasheh S, Saitou M, Tsukita S, Fromm M. Epithelial transport and barrier function in occludin-deficient mice// *Biochim Biophys Acta.*2005. 1669(1):34-42.
146. Seiler MW, Rennke HG, Venkatachalam MA, Cotran RS. Pathogenesis of polycation-induced alterations ("fusion") of glomerular epithelium// *Lab Invest.* 1977. 36(1):48-61.
147. Seiler MW, Venkatachalam MA, Cotran RS. Glomerular epithelium: structural alterations induced by polycations// *Science.*1975. 189(4200):390-3.
148. Shpakov AO, Gur'ianov IA, Baianova NV, Vlasov GP. The receptor of serpentine type and the heterotrimeric G protein as targets of action of the polylysine dendrimers// *Tsitologiya.* 2008 50(12):1036-43.
149. Simon D.B., Lu Y., Choate K.A. et al. Paracellin-1, a renal tight junction protein required for paracellular  $Mg^{2+}$  resorption// *Science.*1999. 285 :103-106.
150. Sonntag AK, Bielaszewska M, Mellmann A, Dierksen N, Schierack P, Wieler LH, Schmidt MA, Karch H. Shiga toxin 2e-producing *Escherichia coli* isolates from humans and pigs differ in their virulence profiles and interactions with intestinal epithelial cells// *Appl Environ Microbiol.* 2005. 71(12):8855-63.
151. Staehelin L.A. Further observations on the fine structure of freeze cleaved tight junctions// *J. Cell Sci.* 1973. 13 :763–786.
152. Stevenson BR, Siliciano JD, Mooseker MS, Goodenough DA. Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the

tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia// *J Cell Biol.* 1986.103(3):755-66.

153. Suzuki T., Tanabe S., Hara H. Kaempferol enhances intestinal barrier function through the cytoskeletal association and expression of tight junction proteins in Caco-2 cells// *J. Nutr.* 2011.141(1) : 87-94.

154. Taylor M. , Tuhina Banerjee T., Navarro-Garcia F., Huerta J., Massey S., Burlingame M, Pande A.H., Tatulian S.A, Teter K. A Therapeutic chemical chaperone inhibits Cholera intoxication and unfolding/translocation of the Cholera Toxin A1 subunit// *PLOS ONE.* 2011., e18825.

155. Thorens B. Facilitated glucose transporters in epithelial cells// *Annu Rev Physiol.* 1988. 55 :591-608.

156. Tsukita S, Furuse M, Itoh M. Multifunctional strands in tight junctions// *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001.2(4):285-93.

157. Turner MR, Clough G, Michel CC. The effects of cationised ferritin and native ferritin upon the filtration coefficient of single frog capillaries. Evidence that proteins in the endothelial cell coat influence permeability// *Microvasc Res.* 1983.25(2):205-22.

158. Tzan CJ, Berg J, Lewis SA. Effect of protamine sulfate on the permeability properties of the mammalian urinary bladder// *J Membr Biol.* 1993. 133(3):227-42.

159. Ugolev A.M., Zaripov B.Z., Iezuitova N.N. Membrane digestion and transport under physiological conditions: a review of available data// *Gen. Physiol. Biophys.* 1985.4 : 287-299.

160. Ullmer C, Schmuck K, Figge A, Lübbert H. Cloning and characterization of MUPP1, a novel PDZ domain protein// *FEBS Lett.* 1998.424(1-2):63-8.

161. Umeda K, Ikenouchi J, Katahira-Tayama S, Furuse K, Sasaki H, Nakayama M, Matsui T, Tsukita S, Furuse M, Tsukita S. ZO-1 and ZO-2 independently determine where claudins are polymerized in tight-junction strand formation// *Cell.*2006. 126(4):741-54.

162. Van Itallie C., Rahner C., Anderson J.M. Regulated expression of claudin-4 decreases paracellular conductance through a selective decrease in sodium permeability// *J Clin Invest.*2001. 107 :1319-27.

163. Van Itallie CM, Fanning AS, Anderson JM. Reversal of charge selectivity in cation or anion-selective epithelial lines by expression of different claudins// *Am J Physiol Renal Physiol.* 2003.285(6):F1078-84.

164. Van Itallie CM, Rogan S, Yu A, Vidal LS, Holmes J, Anderson JM. Two splice variants of claudin-10 in the kidney create paracellular pores with different ion selectivities// *Am J Physiol Renal Physiol.* 2006.291(6):F1288-99.

165. Van Itallie CM, Fanning AS, Bridges A, Anderson JM. ZO-1 stabilizes the tight junction solute barrier through coupling to the perijunctional cytoskeleton// *Mol Biol Cell.* 2009. 20(17):3930-40.

166. Watanabe C., Kato Y., Ito S. Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger 3 affects transport property of H<sup>+</sup>/oligopeptide transporter 1// *Drug Metab Pharmacokinet.* 2005.20(6) :443-451.

167. Weber S, Schneider L, Peters M, Misselwitz J, Rönnefarth G, Böswald M, Bonzel KE, Seeman T, Suláková T, Kuwertz-Bröking E, Gregoric A, Palcoux JB, Tasic V, Manz F, Schärer K, Seyberth HW, Konrad M. Novel paracellin-1 mutations in 25 families with familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis// *J Am Soc Nephrol.* 2001. 12(9):1872-81.

168. Wei L., Yang J., He X. et al. Structure and function of a potent lipopolysaccharide-binding antimicrobial and anti-inflammatory peptide// *J. Med. Chem.*2013. 56(9): 3546-3556. 7.

169. Wen H, Watry DD, Marcondes MC, Fox HS. Selective decrease in paracellular conductance of tight junctions: role of the first extracellular domain of claudin-5//*Mol Cell Biol.*2004. 24(19):8408-17.

170. Weng X.-H., Beyenbach W., Quaroni A. Cultured monolayers of the dog jejunum with the structural and functional properties resembling the normal epithelium//*Am J Physiol. Gastrointest Liver Physiol.*2005. 288 :705-717.

171. Wong V, Gumbiner BM. A synthetic peptide corresponding to the extracellular domain of occludin perturbs the tight junction permeability barrier// *J Cell Biol.* 1997.136(2):399-409.

172. Yang H, Wang B, Wang T, Xu L, He C, Wen H, Yan J, Su H, Zhu X. Toll-Like receptor 4 prompts human breast cancer cells invasiveness via Lipopolysaccharide stimulation and is overexpressed in patients with lymph node metastasis// *PLOS ONE.* 2014. e109980.

173. Yu A.S., Enck A.H., Lencer W.I. et al. Claudin-8 expression in Madin-Darby canine kidney cells augments the paracellular barrier to cation permeation// *J. Biol. Chem.* 2003 278 (19) :17350-17359.

174. Zakrewski SS., Richter JF., Krug SM., Jebautzke B., Lee IF., Rieger J., Sachtleben M., Bondzio A., Schulzke JD., Fromm M., Guntzel D. Improved cell line IPEC-J2, characterized as a model for porcine jejuna epithelium// *PloS One* 2013. 8(11)e 79643.

175. Zeissig, S., Bürgel, N., Günzel, D., Richter, J., Mankertz, J., Wahnschaffe, U., Kroesen, A.J., Zeitz, M., Fromm, M., and Schulzke, J.-D. Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease // *Gut.* 2007 V. 56. 61–72.

176. Zhadanov AB, Provance DW Jr, Speer CA, Coffin JD, Goss D, Blixt JA, Reichert CM, Mercer JA. Absence of the tight junctional protein AF-6 disrupts epithelial cell-cell junctions and cell polarity during mouse development// *Curr Biol.* 1999 9(16):880-8.

177. Zhu C, Ye JL, Yang J, Yang KM, Chen Z, Liang R, Wu XJ, Wang L, Jiang ZY. Differential expression of intestinal ion transporters and water channel aquaporins in young piglets challenged with enterotoxigenic *Escherichia coli* K88// *J Anim Sci*. 2017. 95(12):5240-5252., 2017.

178. Zweibaum A, Triadou N, Kedinger M, Augeron C, Robine-Léon S, Pinto M, Rousset M, Haffen K. Sucrase-isomaltase: a marker of foetal and malignant epithelial cells of the human colon// *Int J Cancer*. 1983.32(4):407-12.