На правах рукописи

Федорова

Арина Александровна

РЕГУЛЯЦИЯ УАБАИНОМ БАРЬЕРНОЙ ФУНКЦИИ ЭПИТЕЛИЯ ТОЩЕЙ И ТОЛСТОЙ КИШКИ КРЫСЫ И МОНОСЛОЯ ЛИНИИ КЛЕТОК IPEC-J2

1.5.5. – физиология человека и животных

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Санкт-Петербург

2023

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

Научный руководитель: **Марков Александр Георгиевич** - доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой общей физиологии, Санкт-Петербургский государственный университет

Официальные оппоненты: **Золотарев Василий Авенирович** - доктор биологических наук, заведующий лабораторией физиологии пищеварения Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук, Санкт-Петербург

Кутина Анна Вячеславовна - кандидат медицинских наук, заведующая лабораторией физиологии почки и водно-солевого обмена Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук, Санкт-Петербург

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург

Защита состоится **« »**_____ 2023 г. в _____ часов на заседании Диссертационного совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д 24.1.137.01 при Институте физиологии им. И.П. Павлова РАН по адресу: 199034, Санкт-Петербург, наб. Макарова, д. 6.

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

Автореферат разослан «___» _____ 2023 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук Ордян Наталья Эдуардовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Одной из актуальных проблем физиологии висцеральных систем остается изучение молекулярных механизмов, лежащих в основе проницаемости тканевых барьеров различных органов, а также способов ее регуляции. Комплекс плотных контактов, локализованный в апико-латеральной зоне эпителиальных клеток, является основным структурным компонентом эпителия, который обеспечивает межклеточную диффузию ионов, молекул воды и органических макромолекул (Tsukita et al., 2019). Белки плотных контактов образуют функциональный кластер (Markov et al., 2015), который с помощью адаптерных белков и протеинкиназ формирует сигнальную платформу (Zahraoui et al., 2000). Плотные контакты образованы трансмембранными белками нескольких типов. Основными молекулярными компонентами, которые определяют избирательность межклеточного транспорта ионов и воды, являются белки семейства клаудина. Эти белки разделяют на две группы в соответствии с их вкладом в парацеллюлярную проницаемость: клаудины, которые снижают проницаемость эпителия (клаудин-1, -3, -4, -5, -6, -8, -12, -18 и -19), и клаудины, которые способствуют повышению парацеллюлярной проницаемости для малых катионов и молекул воды (клаудин-2, -10 и -15) (Günzel, Yu, 2013). Клаудины экспрессируются органо- и тканеспецифическим образом, что определяет различие в функциях, например, различных сегментов кишки. Кроме того, в регуляции парацеллюлярной проницаемости для органических молекул участвуют трицеллюлин и окклюдин. Снижение уровня данных белков в эпителии приводит к увеличению проницаемости для макромолекул, но не для ионов (Krug et al., 2009).

Поскольку молекулярный комплекс белков плотных контактов представляет собой функциональную платформу, существует ряд ассоциированных с ним регуляторных белков. Одним из таких важнейших белков является Na, K-АТФаза, которая, возможно, играет роль в функционировании этого комплекса. Экспериментальные данные по этому вопросу немногочисленны и получены в основном на клеточных линиях. Так, известно, что модуляция активности Na,K-АТФазы в культуре клеток почки собаки MDCK II, а также в линии клеток Сертоли влияет на изменение уровня клаудинов, снижающих проницаемость эпителия (Larre et al., 2014; Dietze et al., 2015a; Rajamanickam et al., 2017a). Однако исследования вклада Na, K-АТФазы в барьерные свойства эпителия на тканевом уровне не проводились.

Важнейшим тканевым барьером в организме является эпителий кишечника, который обеспечивает процессы транспорта ионов и макромолекул, сопряженные с транспортом ионов натрия. Важной особенностью кишечного эпителия является специфическое распределение клаудинов в различных сегментах кишки, которое коррелирует с их функциями (Markov et al., 2010). Трансцеллюлярный транспорт ионов и органических молекул, в основе которого лежит

активность натриевой помпы, и межклеточный транспорт, определяемый белками плотных контактов, сопряжены между собой и обеспечивают осуществление функций эпителия (Rajasekaran et al., 2008). Поэтому изучение функционального взаимодействия Na,K-АТФазы и белков плотных контактов является важной задачей в понимании механизмов регуляции функций тканевого барьера. В качестве инструмента для модуляции работы Na,K-АТФазы используют ее специфический лиганд уабаин (Kravtsova et al., 2020). Исследование гормон-подобных соединений, инкретинов, местных факторов регуляции рассматривается как актуальное направление в исследовании барьерных свойств эпителия (Кутина et al., 2019; Золотарев, Хропычева, 2021). Необходимо отметить, что уабаин как гормон, синтезируемый в коре надпочечников и гипоталамусе, обычно определяется в системном кровотоке в диапазоне наномолярных концентраций. Данные о способности таких концентраций уабаина влиять на барьерные свойства эпителия немногочисленны и представлены только в работах на клеточных культурах (Larre et al., 2014; Rincon-Heredia et al., 2014; Dietze et al., 2015a; Rajamanickam et al., 2017a). Актуальной задачей является исследование роли уабаина в регуляции барьерных функций кишки, поскольку в настоящее время данных об изменении белков плотных контактов и проницаемости эпителия кишки при повышении его концентрации в системном кровотоке животных нет.

Необходимо отметить, что эпителиальные барьеры являются динамическими структурами, изменяющими свои свойства в ответ на различные факторы, в том числе на бактериальные токсины (Markov et al., 2014, 2019). Одной из хорошо разработанных методик инициирования нарушений барьерных функций кишечника является использование липополисахарида (ЛПС) клеточной стенки грамотрицательных бактерий (Mercer et al., 1996). Попадая в кровоток, ЛПС разрушает эпителиальный барьер тонкой кишки, в том числе, снижая уровни клаудинов, обеспечивающих непроницаемость эпителия, и увеличивая уровни порообразующих клаудинов (Ribeiro et al., 2018). В работе с эпителием легких у мышей было обнаружено, что низкая концентрация уабаина предотвращает ЛПС-индуцированное воспаление (Wang et al., 2018), что позволяет предположить его возможную протекторную роль и в других типах эпителиев. Исследование механизмов предотвращения и восстановления свойств тканевых барьеров, в том числе в различных отделах кишечника, в условиях физиологических нарушений, которые могут быть вызваны в том числе компонентами клеточных стенок бактерий (липополисахариды) на данный момент является малоизученной проблемой.

Таким образом, **целью** данного исследования было изучение барьерных функций и уровня белков плотных контактов клеточной линии IPEC-J2, а также тощей и толстой кишки

крысы при длительном действии уабаина, а также при предварительном применении уабаина в модели липополисахарид-индуцированного нарушения функций эпителия.

Задачи исследования:

1. Изучение трансэпителиального сопротивления клеточной линии IPEC-J2 при действии уабаина и липополисахарида
2. Определение уровня и локализации белков плотных контактов методом Вестерн-блот и иммуноцитохимии в линии клеток IPEC-J2 при действии уабаина и липополисахарида
3. Изучение барьерных свойств эпителия тощей и толстой кишки крысы при действии уабаина и липополисахарида
4. Морфометрический анализ эпителиального слоя тощей и толстой кишки крысы при действии уабаина и липополисахарида
5. Определение уровня белков плотных контактов методом Вестерн-блот тощей и толстой кишки крысы при действии уабаина и липополисахарида

Научная новизна. Впервые с применением комплекса физиологических и молекулярно-биологических методов обнаружено регулирующее действие кардиотонического стероида уабаина на барьерные свойства эпителия кишки. Получены первые приоритетные данные о том, что уабаин в наномолярной концентрации, которая соответствует его концентрации в плазме крови, сегмент-специфически воздействует на барьерные свойства тощей и толстой кишки крысы. Выявлена избирательность влияния уабаина на уровень белков семейства клаудина, а также окклюдина и трицеллюлина в плотных контактах эпителия клеточной линии IPEC-J2 и разных сегментов кишки крысы. Впервые было показано, что уабаин в клеточной линии IPEC-J2 увеличивает уровень клаудина-1 и -5, активируя cSrc-киназу. К приоритетным результатам стоит отнести данные о том, что 4-х дневное применение уабаина в толстой кишке увеличивает уровень клаудинов, вносящих вклад в непроницаемость эпителия, и способствует уменьшению уровня клаудинов, которые регулируют транспорт воды и ионов натрия по парацеллюлярному пути, в эпителии тощей кишки. При последовательном применении наномолярной концентрации уабаина и липополисахарида впервые было показано, что уабаин предотвращает нарушение барьерных свойств эпителия кишки, которое было вызвано эндотоксином. Впервые установлено, что протективное действие уабаина в условиях липополисахарид-индуцированного нарушения функций кишки связано с предотвращением снижения уровня клаудина-1, -3, -8 и трицеллюлина, и увеличения уровня клаудина-2 в эпителии тощей и толстой кишки.

Теоретическая и практическая значимость работы. Данное исследование способствует решению фундаментальной задачи физиологии – изучению молекулярных основ и механизмов регуляции свойств тканевых барьеров. Результаты такого исследования

необходимы и важны для формирования представлений о механизмах взаимосвязи трансцеллюлярного и парацеллюлярного транспорта в эпителии. Развитие этого нового направления открывает путь к разработке новых соединений для выработки тактики предупреждения и лечения функциональных расстройств кишечника, в том числе воспаления. Результаты диссертации входят в учебные курсы по физиологии в рамках программы бакалавриата, используются в специализированных курсах для магистров («Иммунология воспаления», «Молекулярная эндокринология», «Тканевые барьеры») читаемые на биологическом факультете Санкт-Петербургского государственного университета, а также могут быть использованы при чтении курсов в медицинских и фармацевтических ВУЗах.

Методология и методы исследования. Получение и анализ результатов на экспериментальных моделях различной сложности (клеточная линия и разные сегменты кишки) являлось основным методологическим подходом для формирования представлений о механизмах функционирования и регуляции тканевого барьера. Для получения полноценных данных был применен комплекс методик, позволяющих оценить происходящие процессы. Исследование барьерных функций эпителия проводили, используя электрофизиологический метод и изменение межклеточной проницаемости для флуоресцентного зонда. Световая микроскопия была использована для оценки гистологических параметров объектов. Изменение в уровне белков, отвечающих за формирование барьерных свойств, а также белков внутриклеточного сигналинга, анализировали с помощью Вестерн-блота. Иммуногистохимические методы с последующей визуализацией сигнала на конфокальном микроскопе использовали для оценки локализации белков.

Положения, выносимые на защиту.

1. Уабаин является фактором регуляции барьерных свойств эпителия в тонкой и толстой кишке, изменяя уровни белков плотных контактов, которые обеспечивают избирательный вклад в межклеточную проницаемость.

2. Повышение уровня уабаина в плазме крови животных оказывает протективное действие против ЛПС-индуцированного повреждения барьерных свойств эпителия, предотвращая изменения уровня белков плотных контактов, обеспечивающих селективную проницаемость для ионов, воды и макромолекул.

Личный вклад автора. Автор внес значительный вклад в разработку концепции научного исследования и решающий вклад в обсуждение рабочего плана, в получение и анализ результатов. Экспериментальные данные при работе с крысами получены автором лично. Основная работа с культурами клеток была проведена лично автором на базе Свободного университета Берлина (Германия) и на базе университета Орхус (Дания).

Степень достоверности. Применение разнообразных и адекватных поставленным задачам электрофизиологических и молекулярно-биологических методов позволили получить достоверные результаты и сделать обоснованные выводы. Количество проведенных экспериментов и применение соответствующих методов статистического анализа являются основанием достоверности полученных результатов. Основные результаты исследования прошли этапы независимой экспертизы при их публикации в ведущих российских и международных рецензируемых журналах, а также при представлении докладов по теме диссертации на конференциях.

Апробация результатов исследования. По материалам диссертации было опубликовано 3 статьи в журналах из списка, рекомендованного ВАК. Результаты работы были представлены для обсуждения на многочисленных Всероссийских и Международных конференциях, в частности на 98-ом Съезде немецкого физиологического общества (г. Ульм, Германия), XXIII Съезде Физиологического общества им. И.П. Павлова, Международной медико-биологической научной конференции молодых ученых «Фундаментальная наука и клиническая медицина. Человек и его здоровье», Национальной конференции по естественным и гуманитарным наукам с международным участием «Наука СПбГУ – 2020». По результатам всех конференций были опубликованы тезисы докладов.

Финансовая поддержка работы. Часть работы была профинансированы грантом РНФ №18-15-00043 «Молекулярное разнообразие и функциональное взаимодействие Na,K-АТФазы и клаудинов» (рук. И.И. Кривой). Исследования на клеточной культуре IPEC-J2 в Свободном университете Берлина были поддержаны стипендией программы межвузовского сотрудничества «Erasmus+». Исследования автора были поддержаны стипендией Правительства РФ для аспирантов с 2021 по 2022 гг., и поддерживаются с 2022 по 2023 гг.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа содержит 128 страниц машинописного текста и включает список сокращений, обзор литературы, описание материалов и методов, результаты, их обсуждение, заключение и выводы. Список литературы включает 270 источников. В работе представлены 4 таблицы и 21 рисунок.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты с линией клеток IPEC-J2. В экспериментах использовали клеточную линию эпителия тощей кишки свиньи IPEC-J2. Культивирование клеток происходило в клеточной среде, которая содержала или не содержала уабаин в концентрации 10 нМ (группы Уабаин и Контроль, соответственно). Начиная с 5-го дня культивирования каждые 2-3 дня регистрировали трансэпителиальное сопротивление (ТЭС) клеточного монослоя для оценки изменения барьерных свойств. На 24 день в клеточную линию добавляли липополисахарид

(10 мкг/мл) с апикальной стороны (группы ЛПС и Уабаин+ЛПС). Измерение ТЭС проводили через 0, 12 и 24 час после начала инкубации с ЛПС.

Определение уровня белков плотных контактов в клеточной линии IPEC-J2 при действии уабаина и ЛПС методом Вестерн блот. Вестерн блот был использован в модификации Stain-Free, в которой используется полиакриламидный гель, содержащий запатентованное тригалогенсодержащее соединение, которое ковалентно связывается с остатками триптофана, усиливая их флуоресценцию при воздействии УФ-излучения, что позволяет использовать общий белок в качестве контроля нагрузки. Для разделения выделенной фракции белков использовался вертикальный электрофорез в Stain-Free геле (содержание полиакриламида (ПААГ) – 10%) при 150 В (60 мин). Перенос с геля на поливинилденфторидные (ПВДФ) мембраны проводили при 100 В, 90 мин. Использовали первичные мышиные антитела против клаудина-5 и кроличьи антитела против клаудина-1, -3, -4, -8 и трицеллюлина, а также вторичные антимышиные и антикроличьи антитела с HRP-меткой. Детекцию сигнала осуществляли на анализаторе изображений Chemi-Doc XRS+. Белки интереса нормализовали на общий белок.

Определение уровня cSrc и pcSrc в клеточной линии IPEC-J2 в условиях длительного применения уабаина методом Вестерн блот. Вестерн блот был использован в модификации Stain-Free. Для разделения выделенной фракции белков использовался вертикальный электрофорез в градиентных полиакриламидных гелях (ПААГ - 4-20%) при 150 В (60 мин). Перенос с геля на ПВДФ мембраны осуществляли при 100 В, 90 мин. Использовали первичные мышиные антитела против pcSrc и кроличьи антитела против cSrc, а также вторичные антимышиные и антикроличьи антитела с HRP-меткой. Детекцию сигнала осуществляли в системе визуализации c600 (Azur Biosystems, США). Белки интереса нормализовали на общий белок.

Иммунофлуоресцентное окрашивание парафиновых срезов для изучения локализации белков плотных контактов в клеточной линии IPEC-J2. Клетки IPEC-J2 фиксировали в 4% формалине и заключали в парафин по стандартной методике (Marisa et al., 2011). Парафиновые блоки были нарезаны, срезы депарафинизировали в ксилоле и проводили через ряд спиртов нисходящей концентрации. После пермеабилизации (цитратный буфер, pH 6,0) и блокирования (10% БСА) предметные стекла инкубировали с первичными кроличьими антителами против клаудина-1, -3 -8 и трицеллюлина, мышиными антителами против клаудина-5. Впоследствии использовали вторичные антитела Alexa Fluor-488 и -594, а также DAPI для окраски ядер. Срезы визуализировали с использованием конфокального лазерного сканирующего микроскопа Zeiss 710.

Эксперименты с животными. В экспериментах использовали самцов крыс Вистар массой 200-250 г. Исследования на животных выполняли в соответствии со стандартами, принятыми организациями по работе с лабораторными животными FELASA и RusLASA. Для повышения уровня уабаина в плазме крови основывались на протокол эксперимента, который был описан ранее (Kravtsova et al., 2020). Крысам ежедневно вводили уабаин (1 мкг/кг, в/б) в течение 4 дней (группа Уабаин). В качестве контроля использовали группу животных, которым по той же схеме вводили физиологический раствор (группа Контроль). На 4-ый день через 2 часа после инъекции уабаина крысам из группы ЛПС и Уабаин+ЛПС в/б вводили липополисахарид (1 мг/кг, в/б). Через 24 часа крыс декапитировали и извлекали ткань тощей и толстой кишки.

Регистрация электрофизиологических характеристик в камере Уссинга. Для исследования барьерных характеристик тканей тощей и толстой кишки использовали камеру Уссинга. В камере измеряли ток «короткого замыкания», отражающий процессы активного транспорта, и трансэпителиальное сопротивление – параметр, характеризующий непосредственно барьерные свойства ткани. Для изучения проницаемости парацеллюлярного пути для макромолекул в эпителии был использован флуоресцеин натрия (376 Да), который добавляли с апикальной стороны эпителия в камеру Уссинга. Через 60 минут с базолатеральной стороны ткани отбирали раствор для определения концентрации, диффундировавшего через ткань флуоресцеина натрия.

Определение уровня белков плотных контактов в тощей и толстой кишке крысы при действии уабаина и ЛПС методом Вестерн блот. Вестерн блот был использован в модификации Stain-Free. Для разделения выделенной фракции белков использовался вертикальный электрофорез в Stain-Free геле (ПААГ – 10%) при 150 В (60 мин). Белки переносили с геля на ПВДФ мембраны полусухим методом (7 мин, 25 В). Использовали первичные мышиные антитела против клаудина-5 и кроличьи антитела против клаудина-1, -2, -3, -4, -8, окклюдина и трицеллюлина, а также вторичные антимышиные и антикроличьи антитела с HRP-меткой. Детекцию сигнала осуществляли на анализаторе изображений Chemi-Doc XRS+. Белки интереса нормализовали на общий белок.

Световая микроскопия и оценка морфологических изменений структуры препаратов эпителиального слоя тощей и толстой кишки крысы. Для оценки морфологических изменений структуры ткани фрагменты тонкой и толстой кишки заливали в парафиновые блоки и подготавливали срезы согласно стандартной методике (Sadeghipour, Babaheidarian, 2019). Полученные срезы монтировали на предметные стекла, проводили процедуру депарафинизации, после которой срезы окрашивали гематоксилином Майера (20 мин; 22°C) и эозином на водной основе (5 мин; 22ºC). Оценку морфологических изменений и

гистологической структуры тканей проводили на инвертированном световом микроскопе фирмы Leica D 6000.

Статистическая обработка полученных результатов. Статистическую обработку данных выполняли с помощью программы GraphPadPrism v.8. При обработке результатов сравнительного анализа ТЭС в клеточной линии IPEC-J2, ТЭС и тока «короткого замыкания» ткани тощей и толстой кишки крысы применяли двухфакторный дисперсионный анализ с поправкой Даннета. Обработка данных после проведения Вестерн блот анализа, а также морфометрия ткани тощей и толстой кишки проводилась с использованием однофакторного дисперсионного анализа с поправкой Тьюки. Данные представлены в виде средних значений ± стандартная ошибка среднего. Уровень значимости $p < 0.05$ принимался как статистически значимый.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Эксперименты с клеточной линией IPEC-2.

Изменение трансэпителиального сопротивления клеточной линии IPEC-J2 при действии уабаина, ЛПС и их последовательного применения. Во время инкубации контрольной группы клеточной линии IPEC-J2 наблюдалось постепенное увеличение ТЭС с 87 ± 8 до 3289 ± 125 Ом·см^2 (n = 12). Уабаин (10 нМ; n = 12) на начальных этапах формирования монослоя замедлял прирост ТЭС. Однако это воздействие с течением времени уменьшалось, и к 19-му дню культивирования этот параметр не имел отличий от группы контроля. При дальнейшей инкубации клеток с уабаином динамика изменения ТЭС практически совпадала с таковой для контрольной группы клеток линии IPEC-J2 (рис. 1). Исходное значение ТЭС в группе, которая была инкубирована с ЛПС, не отличалось от такового в контрольной группе и составляло 2937 ± 301 Ом·см^2. После внесения эндотоксина (10 мкг/мл, апикально) в среду инкубации клеток IPEC-J2 происходило достоверное снижение ТЭС до величины 2583 ± 258 Ом·см^2 (n = 6; $p < 0.001$). Внесение липополисахарида в среду инкубации клеток IPEC-J2, которые с момента высевания

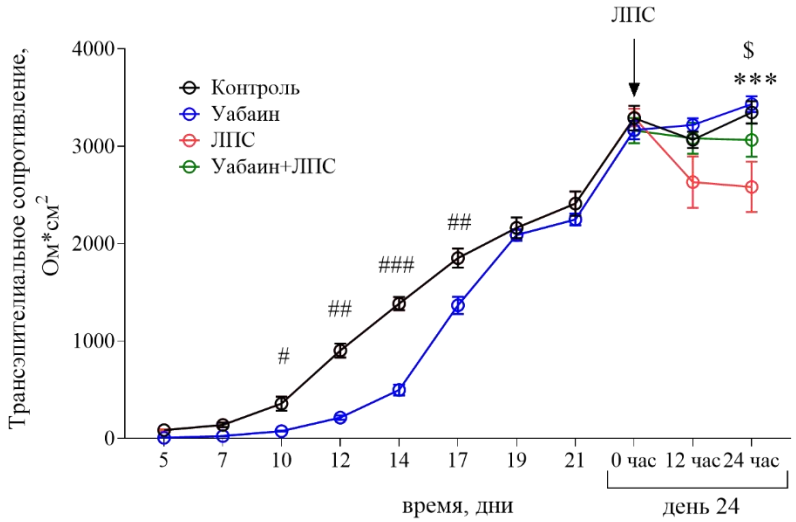

Рис 1. Изменение трансэпителиального сопротивления при действии уабаина и липополисахарида на клеточную линию IPEC-J2
*Достоверные отличия: # - Контроль vs. Уабаин; * - Контроль vs. ЛПС; $ - ЛПС vs. Уабаин+ЛПС*

подвергались действию уабаина, не приводило к изменению величины ТЭС. Через 24 час она составляла 3064 ± 170 Ом·см^2 и не отличалась от ТЭС контрольной группы (3347 ± 115 Ом·см^2), а также от ТЭС в группе Уабаин (3162 ± 130 Ом·см^2) (рис. 1). Полученные данные свидетельствуют о том, что после формирования слоя клеток IPEC-J2 уабаин в наномолярной концентрации не влияет на проницаемость эпителия, но в то же время предотвращает изменение барьерных свойств эпителия, вызванных применением липополисахарида.

Изменение уровня белков плотных контактов в клеточной линии IPEC-J2 в условиях длительного применения уабаина. Анализ уровня клаудинов в клеточной линии IPEC-J2 проводили в тех же образцах, которые были исследованы электрофизиологическим методом. Методом Вестерн блот была выявлена разница в интенсивности сигнала при применении уабаина. Уровень клаудина-1 и -5 увеличивался при действии уабаина (10 нМ) по сравнению с контролем ($n = 6$; $p < 0.05$). Содержание клаудина-3, -4, -8 и трицеллюлина не имело статистически значимого отличия от контроля (рис. 2 А).

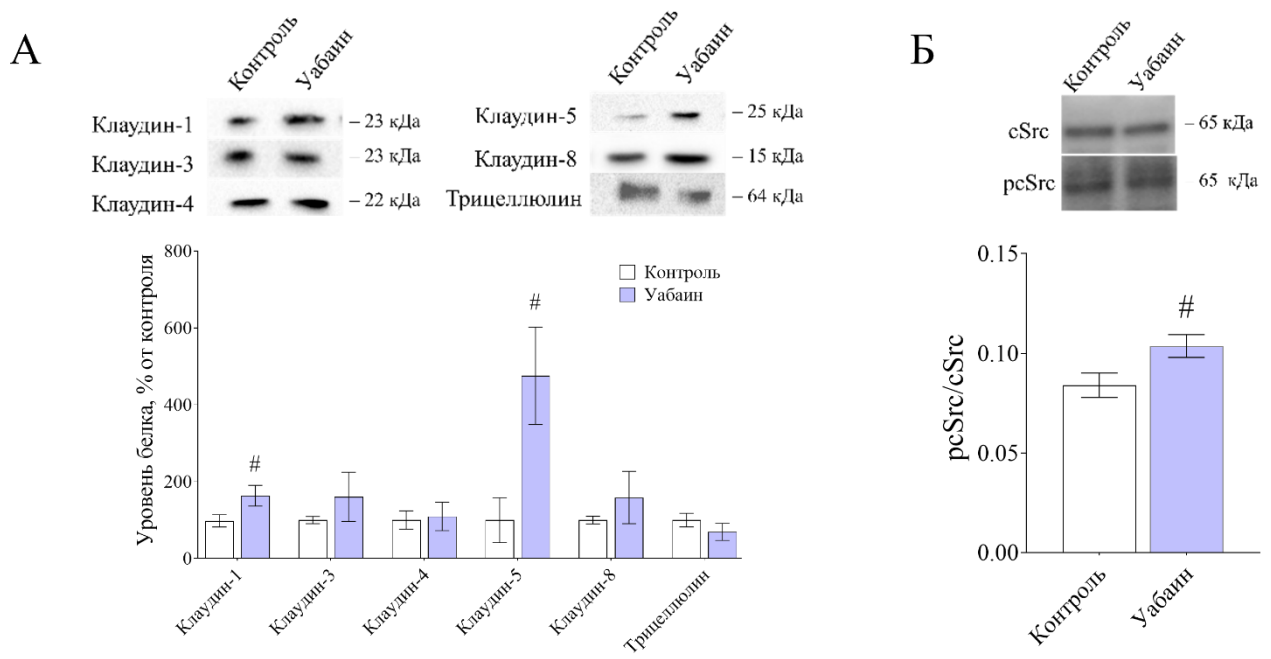

Рис. 2 Изменение уровня белков плотных контактов (А), и белков сигнального пути - киназы cSrc и pcSrc (Б) - в клеточной линии IPEC-J2 при длительном действии уабаина
Верхние панели – репрезентативные иммуноблоты.
Достоверные отличия: # - Контроль vs. Уабаин

Изменение уровня киназы cSrc и pcSrc в клеточной линии IPEC-J2 в условиях длительного применения уабаина. Для выяснения возможного сигнального пути, задействованного в изменении белков плотных контактов, были проанализированы активированная киназа cSrc и ее общий уровень, так как известно, что именно эта киназа может быть активирована при действии уабаина. Уровень активированной cSrc-киназы был значительно повышен через 19 дней инкубации с уабаином, при этом общий уровень cSrc не изменялся. Это позволяет сделать вывод, что повышенная активация cSrc является

результатом запускаемого уабаином сигналинга, а не изменением общего уровня cSrc (рис. 2 Б). Таким образом, в клеточной линии IPEC-J2 действие уабаина в наномолярной концентрации увеличивало уровни клаудина-1 и -5, что может быть обсуловлено активацией cSrc-зависимого сигнального пути.

Изменение уровня белков плотных контактов в клеточной линии IPEC-J2 при действии уабаина и ЛПС. Известно, что действие ЛПС на клетки IPEC-J2 вызывает снижение клаудина-1 и -3 (Yan et al., 2017). Поэтому при проведении опытов с использованием ЛПС и ЛПС на фоне уабаина был проведен анализ изменения уровня клаудина-1 и -5, а также клаудина-3. Инкубация клеток с ЛПС (24 час, апикально) привела к уменьшению уровня клаудина-1 и -3 ($n = 4$, $p < 0.05$) (рис. 3 А). Предварительное культивирование клеточной линии IPEC-J2 с уабаином предотвращало снижение уровня клаудина-1 и -3 при действии ЛПС (рис. 3 А).

Таким образом, уабаин в наномолярной концентрации изменяет уровень белков плотных контактов клеточной линии IPEC-J2 и предотвращает уменьшение их уровня, вызываемое липополисахаридом.

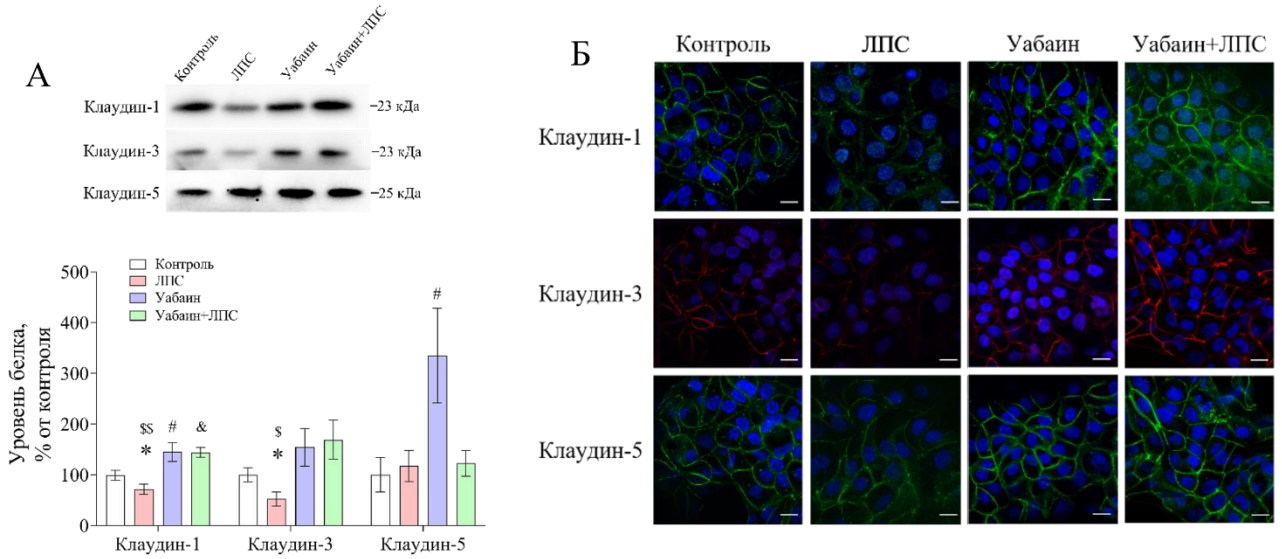

Рис. 3 Изменение уровня белков плотных контактов и их локализации в клеточной линии IPEC-J2 при действии уабаина и ЛПС.
А – изменение уровня белков плотных контактов (верхние панели – репрезентативные иммуноблоты); Б – локализация белков плотных контактов.
*Достоверные отличия: # - Контроль vs. Уабаин; * - Контроль vs. ЛПС; $ - ЛПС vs. Уабаин+ЛПС; & - Контроль vs. Уабаин+ЛПС*

Локализация клаудинов в клеточной линии IPEC-J2 при действии уабаина и ЛПС. Иммунофлуоресцентный сигнал в образцах был обнаружен для клаудина-1, -3, и -5. Действие уабаина не вызывало заметного перераспределения белков плотных контактов в пределах клеток. Сигнал идентифицировался по линии контакта соседних клеток. Внесение в среду инкубации ЛПС приводило к существенному изменению сигнала для клаудина-1.

Вместо сплошной линии, соответствующей соединению клеток в единый пласт, появлялись отдельные точки, что говорит об изменении в локализации или перераспределении белков плотных контактов (рис. 3 Б). Интенсивность сигнала клаудина-3 уменьшалась по сравнению с контролем при действии ЛПС, но характер распределения сигнала сохранился. Предварительное применение уабаина перед липополисахаридом предотвращало изменение локализации клаудина-1 в плазматической мембране клеток, и картина распределения белка напоминала изображение, полученное для контрольной группы (рис. 3 Б). Таким образом, уабаин предотвращает изменение перераспределения клаудина-1 и -3, вызванное применением ЛПС.

Эксперименты на животных

Изменение массы тела животных при действии ЛПС в условиях 4-х дневного применения уабаина. В группе Контроль, которой вводили физиологический раствор (4 суток), масса животных не изменялась (N (количество животных) = 12). Инъекции уабаина (1 мкг/кг, 4 суток) также не приводили к значимым изменениям массы тела животных (N = 8). После однократной инъекции эндотоксина (1 мг/кг) в группе ЛПС (N = 5) произошло достоверное снижение массы тела крыс по сравнению с группой Контроль ($p < 0.001$). Применение ЛПС на фоне предварительного введения уабаина (1 мкг/кг, 4 суток) вызвало также уменьшение массы тела животных в группе Уабаин+ЛПС (N = 6) (рис. 4).

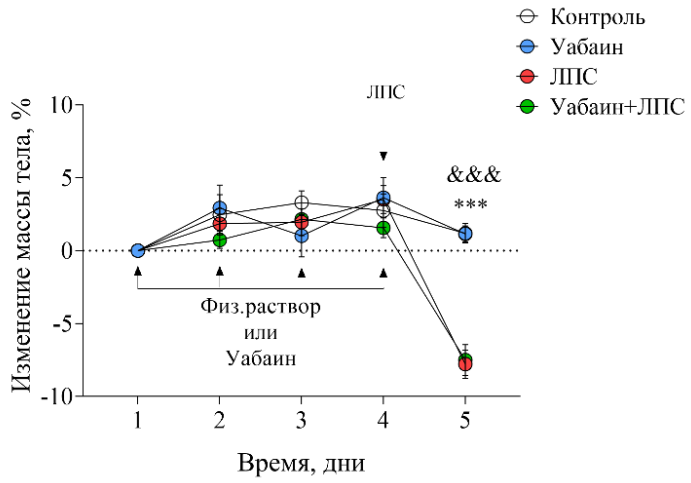

Рис. 4 Изменение массы тела крыс
*Достоверные отличия: * - Контроль vs. ЛПС; & - Контроль vs. Уабаин+ЛПС*

Изменение электрофизиологических параметров и проницаемости тощей кишки при действии ЛПС в условиях 4-х дневного применения уабаина. Динамика ТЭС в тощей кишке была стабильной во всех группах крыс на протяжении 60 минут регистрации в камере Уссинга. На 5-ой минуте в контрольной группе она была равна 46 ± 3 Ом·см^2, на 60-ой минуте – 41 ± 4 Ом·см^2 (n (количество сегментов ткани) = 27). В группе Уабаин величина ТЭС достоверно не отличалась от группы Контроль (n = 27). Введение эндотоксина (1 мг/кг) уменьшало величину ТЭС в тощей кишке по сравнению с контролем почти в два раза (n = 14) ($p < 0.05$). В начале регистрации величина ТЭС составляла 26 ± 4 Ом·см^2 и оставалось сниженной в течение всего периода регистрации. Длительное применение уабаина перед

введением ЛПС (n = 18) приводило к предотвращению снижения ТЭС в тощей кишке. В начале регистрации величина ТЭС составляла 42 ± 5 Ом·см^2, не отличаясь от величины ТЭС в контрольной группе, но была достоверно больше, чем в группе ЛПС ($p < 0.05$) (рис. 5 А).

В контрольной группе ток «короткого замыкания» на 5-й минуте составлял 25 ± 4 мкА и 33 ± 9 мкА на 60-й минуте регистрации. Уабаин при длительном введении не вызывал достоверных изменений данного параметра. Применение ЛПС вызывало увеличение тока «короткого замыкания» по сравнению с группой Контроль более чем в три раза. В начале регистрации этот параметр в группе ЛПС составлял 99 ± 16 мкА ($p < 0.001$). К 35-ой минуте ток «короткого замыкания» в группе ЛПС уже не имел достоверных отличий от контроля. Длительное применение уабаина перед введением ЛПС приводило к снижению величины тока «короткого замыкания» в тощей кишке почти в два раза по сравнению с группой ЛПС, составляя 54 ± 6 мкА в начале регистрации ($p < 0.001$) (рис. 5 Б).

4-х дневное введение уабаина (1 мкг/кг) не влияло на изменение проницаемости ткани тощей кишки для флуоресцеина натрия. В условиях введения ЛПС наблюдали достоверное увеличение проницаемости эпителия по сравнению с контролем ($p < 0.05$). При сочетанном действии уабаина и ЛПС величина проницаемости снижалась до уровня контроля и была достоверно меньше проницаемости в группе ЛПС ($p < 0.05$) (рис. 5 В).

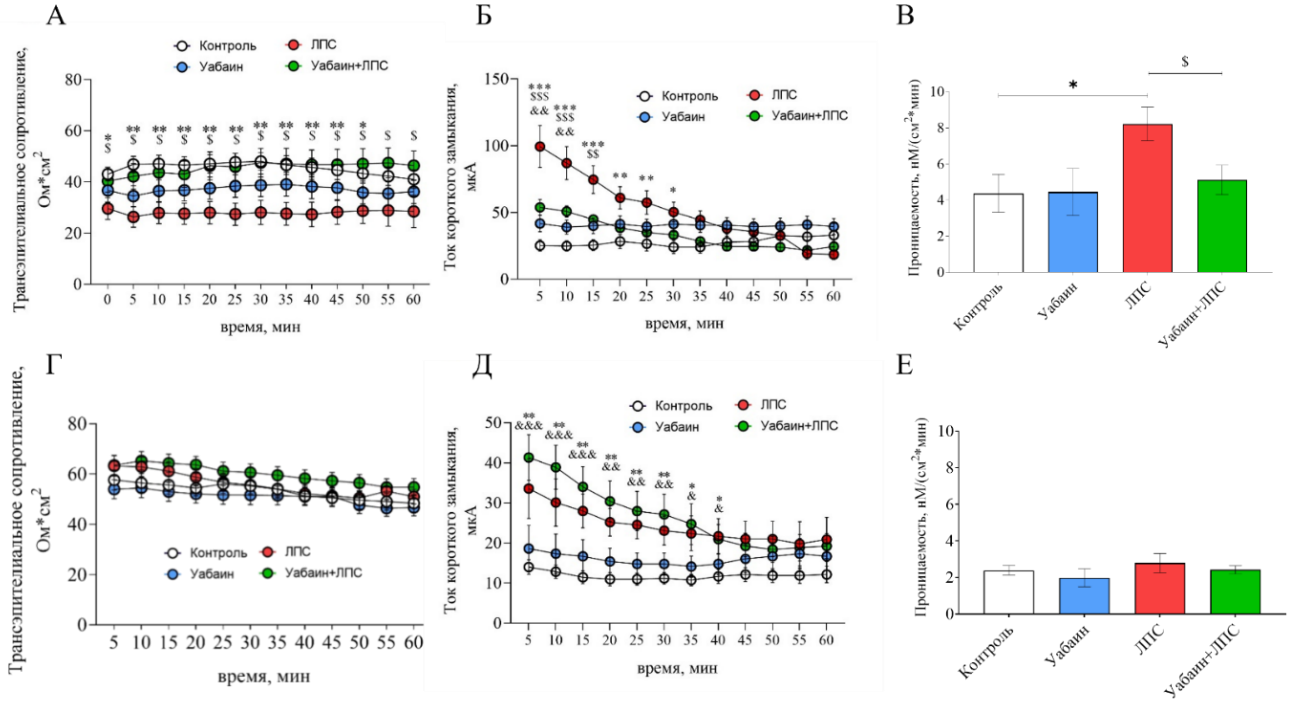

Рис. 5 Изменение барьерных характеристик тощей и толстой кишки крысы при действии уабаина и ЛПС
А - трансэпителиальное сопротивление и Б - ток «короткого замыкания» тощей кишки крысы в течение 60 мин регистрации; В – проницаемость тощей кишки для флуоресцеина натрия; Г - трансэпителиальное сопротивление и Д - ток «короткого замыкания» толстой кишки крысы в течение 60 мин регистрации; Е – проницаемость толстой кишки для флуоресцеина натрия.

*Достоверные отличия: # - Контроль vs. Уабаин; * - Контроль vs. ЛПС; $ - ЛПС vs. Уабаин+ЛПС; & - Контроль vs. Уабаин+ЛПС*

Изменение электрофизиологических параметров и проницаемости толстой кишки при действии ЛПС в условиях 4-х дневного применения уабаина. В толстой кишке на протяжении 60 минут регистрации динамика ТЭС была стабильной во всех группах. Величина ТЭС в контрольной группе (n = 30) составляла 58 ± 4 Ом·см^2 в начале и 48 ± 3 Ом·см^2 в конце регистрации. 4-х дневное введение уабаина (n = 18) не вызывало достоверных изменений ТЭС по сравнению с контролем. В группах ЛПС (n = 16) и Уабаин+ЛПС (n = 19) также не было выявлено изменения величины ТЭС по сравнению с группой Контроль (рис. 5 Г).

В контрольной группе ток «короткого замыкания» в начале регистрации был равен 14 ± 2 мкА, оставаясь неизменным на протяжении всего опыта. Уабаин (1 мкг/кг) при хроническом введении не вызывал достоверных изменений тока «короткого замыкания». Применение липополисахарида приводило к увеличению тока «короткого замыкания» в два с половиной раза и составляло в начале регистрации 34 ± 7 мкА, достоверно отличаясь от группы Контроль ($p < 0.01$). 4-х дневное введение уабаина перед инъекцией ЛПС в толстой кишке усиливало эффект ЛПС, что выражалось в увеличении тока «короткого замыкания» до величины 41 ± 6 мкА ($p < 0.001$). В ходе регистрации величина тока «короткого замыкания» в группе ЛПС и Уабаин+ЛПС снижалась (45 мин) до контрольных значений (рис 5 Д). Проницаемость для флуоресцеина натрия в толстой кишке при всех типах воздействия не менялась по сравнению с контролем (рис. 5 Е). Таким образом, ЛПС вызывает классические по литературным данным изменения в тощей кишке крысы, включая уменьшение ТЭС, увеличение тока «короткого замыкания» и проницаемости. Длительное предварительное применение уабаина предотвращает данные изменения. Ткань толстой кишки в целом оказалась резистентной ко всем типам воздействия. Увеличение тока «короткого замыкания» в толстой кишке при действии ЛПС и комбинированном действии ЛПС и уабаина может быть связано с усилением абсорбции ионов натрия.

Морфология эпителия тощей и толстой кишки крысы при действии ЛПС в условиях 4-х дневного применения уабаина. В препаратах ткани тощей кишки контрольных животных хорошо идентифицировались ворсинки и крипты (рис. 6 А). Общий эффект от применения уабаина проявлялся в увеличении толщины эпителиального слоя. Об этом свидетельствовало увеличение глубины крипт ($p < 0.001$) (рис. 6 Б, Ж), и тенденция к увеличению длины ворсинок по сравнению с контролем ($p = 0.08$) (рис. 6 Д). Одновременно было зарегестрировано уменьшение диаметра крипт и ворсинок по сравнению с контролем ($p < 0.001$) (рис. 6 Е, З). При действии ЛПС происходило достоверное уменьшение длины и диаметра ворсинок ($p < 0.001$) (рис. 6 Д, Е), а также значительное уменьшение глубины крипты и ее диаметра ($p < 0.001$ и $p < 0.001$, соответственно) (рис. 6 Ж, З). Предварительное 4-х дневное введение уабаина перед применением липополисахарида предотвращало уменьшение

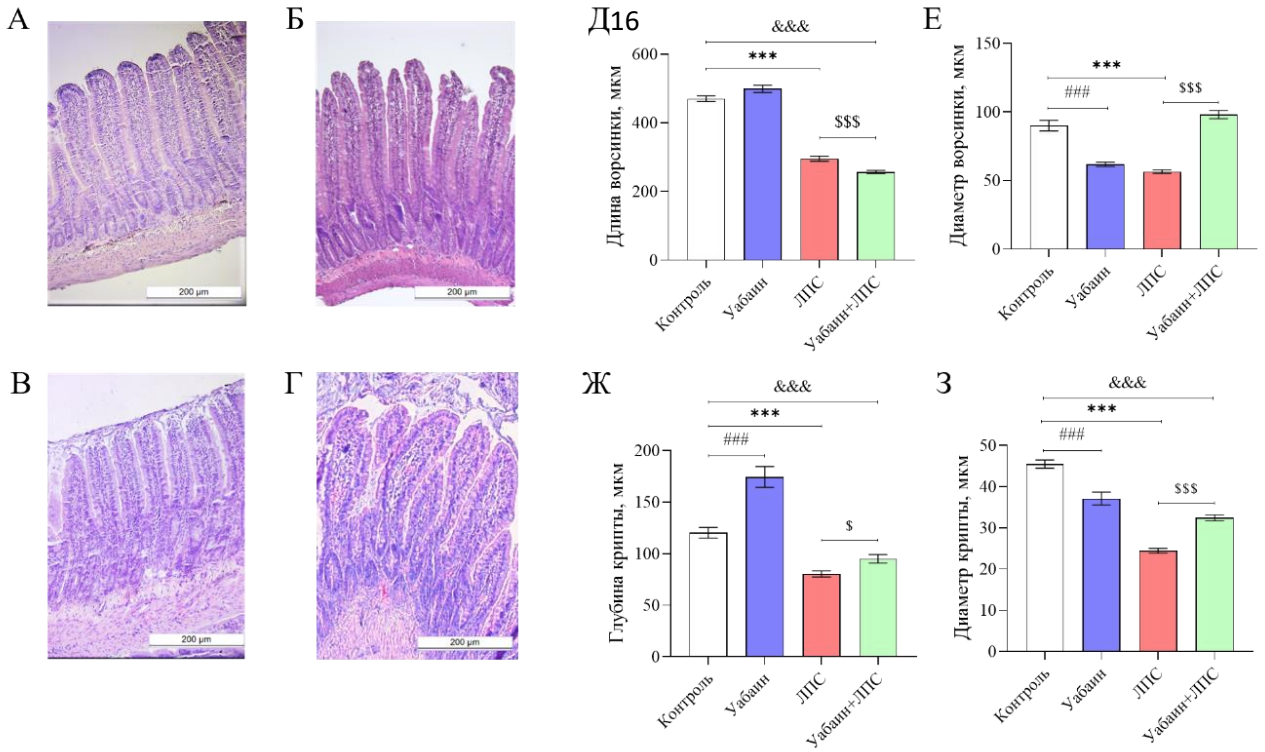

Рис. 6 Гистологическое строение и изменение эпителиального слоя тощей кишки крысы при действии уабаина и ЛПС
А - контроль Б - уабаин; В – ЛПС; Г – уабаин+ЛПС; Д, Е, Ж. З – морфометрия эпителиального слоя тощей кишки
*Достоверные отличия: # - Контроль vs. Уабаин; * - Контроль vs. ЛПС; $ - ЛПС vs. Уабаин+ЛПС; & - Контроль vs. Уабаин+ЛПС*

диаметра ворсинок в группе Уабаин+ЛПС, восстанавливая до диаметра в контрольной группе, увеличивало глубину крипт и их диаметр по сравнению с группой ЛПС ($p < 0.05$ и $p < 0.001$, соответственно) (рис. 6 Ж, З), но не оказывало влияния на длину ворсинок - она дополнительно снизилась по сравнению с группой ЛПС ($p < 0.001$) (рис. 6 Д).

В стенке толстой кишки отмечались хорошо идентифицируемые крипты (рис. 7 А). Применение уабаина достоверно увеличивало глубину и диаметр крипт ($p < 0.001$ и $p < 0.05$, соотвественно) (рис. 7 Д, Е). Введение ЛПС уменьшало глубину крипт ($p < 0.001$) и увеличивало их диаметр по сравнению с контролем ($p < 0.001$) (рис. 7 Д, Е). Предварительно введенный перед инъекцией эндотоксина уабаин приводил к восстановлению параметров эпителиального слоя толстой кишки близким к контрольной группе (рис. 7 Г). Глубина крипт достоверно увеличивалась ($p < 0.001$) по сравнению с глубиной крипт при действии ЛПС (рис. 7 Д, Е). Таким образом, морфология эпителиального слоя тощей кишки изменяется при действии ЛПС, подчеркивая тем самым обнаруженное изменение проницаемости и барьерных свойств эпителия. В целом, предварительное применение уабаина предотвращает эти изменения. В толстой кишке введение ЛПС оказывает разнонаправленное действие на

эпителиальный слой, которое также нивелируется предварительным введением уабаина.

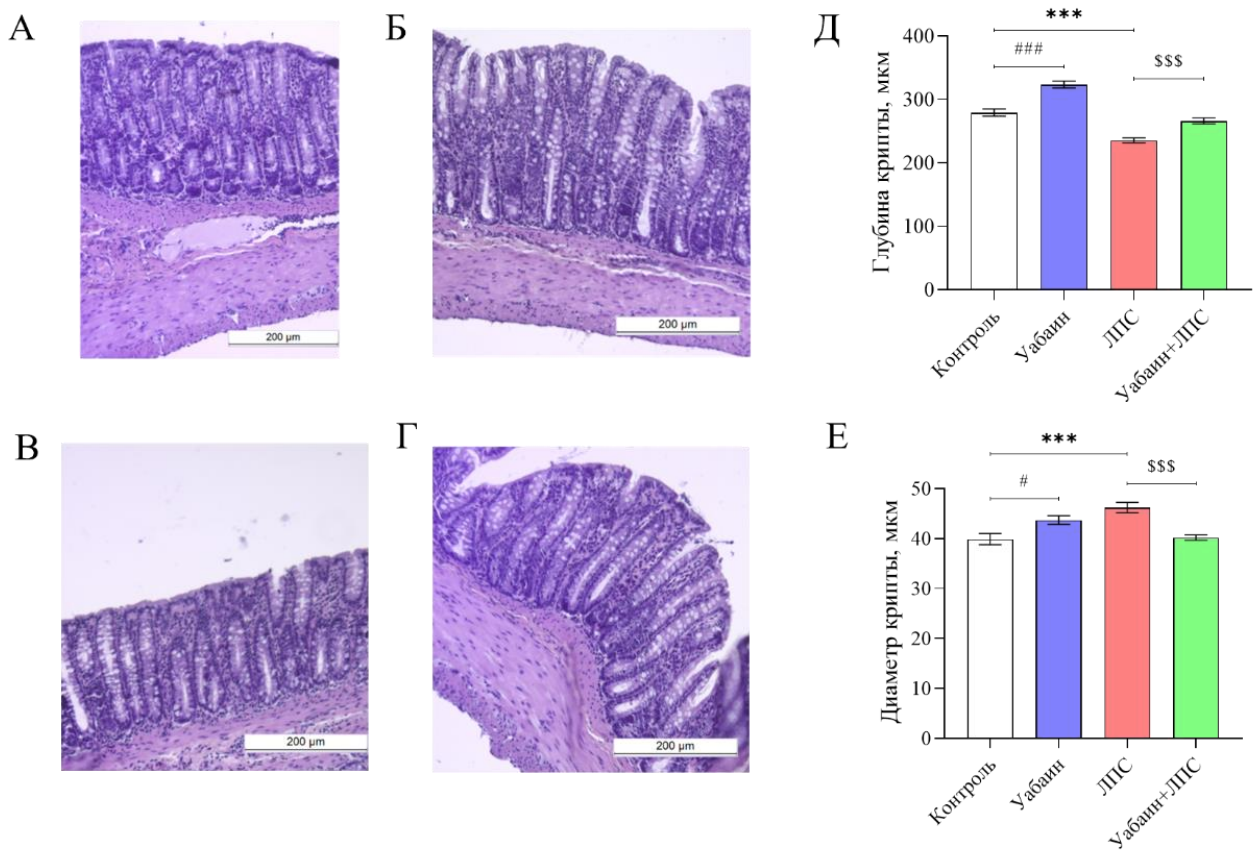

Рис. 7 Гистологическое строение и изменение эпителиального слоя толстой кишки крысы при действии уабаина и ЛПС
А - контроль Б - уабаин; В – ЛПС; Г – уабаин+ЛПС; Д, Е, Ж. З – морфометрия эпителиального слоя тощей кишки
*Достоверные отличия: # - Контроль vs. Уабаин; * - Контроль vs. ЛПС; $ - ЛПС vs. Уабаин+ЛПС*

Изменение уровня белков плотных контактов тощей и толстой кишки крысы при действии ЛПС в условиях 4-х дневного применения уабаина. Методом Вестерн блот было установлено, что уровень клаудина-2 и -8 в тощей кишке уменьшался при 4-х кратном

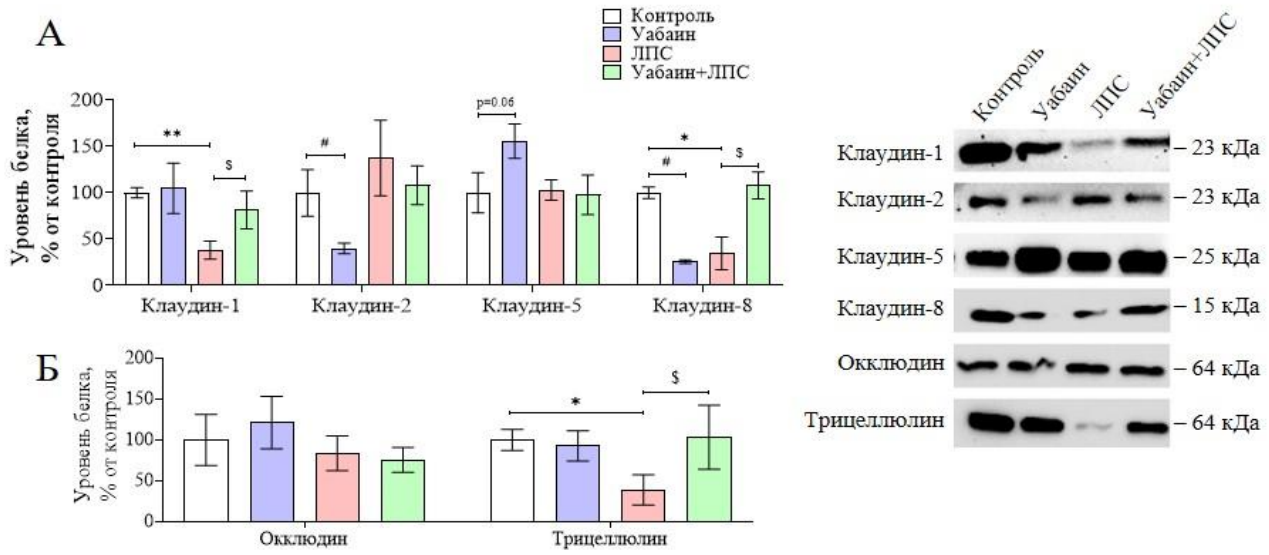

Рис. 8 Изменение уровня белков плотных контактов тощей кишки крысы при действии уабаина и ЛПС
Правые панели – репрезентативные иммуноблоты.

введении уабаина по сравнению с контролем (n = 4; p < 0.05) (рис. 8 А). Уровни клаудина-1, -5, окклюдина и трицеллюлин при данном типе воздействия достоверно не изменялись (рис. 8 А). Через 24 часа после инъекции ЛПС в тощей кишке достоверно уменьшался уровень клаудина-1 и клаудина-8 (n = 4; p < 0.05), а также трицеллюлина (рис. 8 А, Б). Предварительное введение уабаина перед инъекцией эндотоксина предотвращало данное снижение уровня белков плотных контактов.

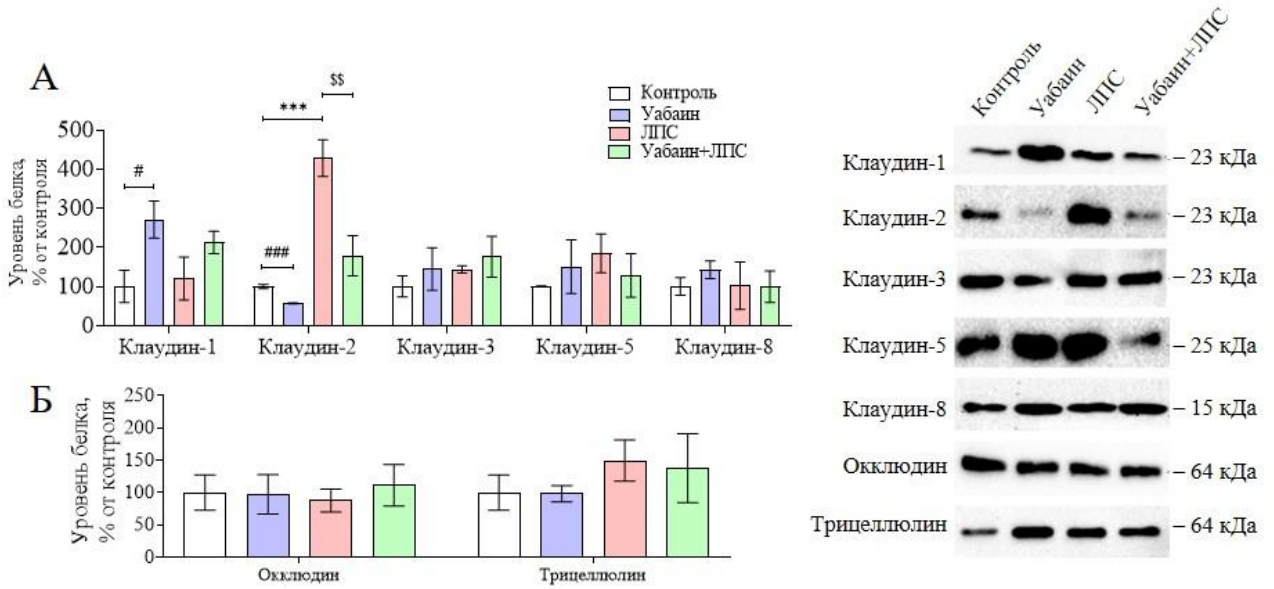

Рис. 9 Изменение уровня белков плотных контактов толстой кишки крысы при действии уабаина и ЛПС Правые панели – репрезентативные иммуноблоты

В толстой кишке обнаружено достоверное увеличение уровня клаудина-1 и уменьшение уровня клаудина-2 при действии уабаина (n = 4; p < 0.05). Введение ЛПС достоверно увеличивало уровни клаудина-2 в толстой кишке по сравнению с контролем (n = 4; p < 0.05). 4-х кратное введение уабаина перед ЛПС предотвращало данное увеличение (рис. 9 А). Уровни клаудина-3, -5, -8, окклюдина и трицеллюлина в толстой кишке не имели статистически значимых отличий от контроля при всех типах воздействия (рис. 9 А, Б). Таким образом, обнаруженные изменения в уровне белков плотных контактов, вносящих разный вклад в проницаемость эпителия тощей и толстой кишки подтверждают полученные данные по измению барьерных свойств и проницаемости эпителия.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Увеличение количества факторов регуляции является необходимым условием повышения надежности работы функциональных систем. В проведенном исследовании была поставлена задача изучения регулирующего влияния кардиотонического стероида уабаина, который в наномолярных концентрациях рассматривается как гормон (Blaustein and Hamlyn, 2020), на регуляцию барьерной функции эпителия в кишке. В этом же ряду следует рассматривать и логическое продолжение этой задачи – изучение его возможного

протективного действия на функции эпителия в случае нарушения свойств последнего при применении липополисахарида. Кроме этого, анализировали молекулярные механизмы сопряжения трансцеллюлярного и парацеллюлярного транспорта, которые могут обеспечиваться путем взаимодействия белков плотных контактов, селективно регулирующих межклеточный транспорт, и Na,K-АТФазы. В основе такой постановки задачи лежит представление о том, что Na,K-АТФаза является не только транспортером ионов, но и важнейшей сигнальной молекулой (Matchkov, Krivoi, 2016). В целом, формирование эпителиального фенотипа определяется развитием комплекса плотных контактов, создающего барьер между апикальной и базолатеральной мембраной эпителиальных клеток (Markov et al., 2015), а также первично-активным транспортом ионов, в основе которого лежит работа Na,K-АТФазы. Таким образом, изучение возможного взаимодействия белков плотных контактов и Na, K-АТФазы может помочь в выяснении молекулярных механизмов такого сопряжения. Для этого были использованы две разные модели - нетрансформированная клеточная линия IPEC-J2, которая хорошо охарактеризована с точки зрения молекулярного состава белков плотных контактов (Vergauwen, 2015), а также эпителий тощей и толстой кишки крысы, поскольку мозаика клаудинов отличается в эпителии различных сегментов кишечника (Markov et al., 2010).

Результаты свидетельствуют, что уабаин регулирует барьерные функции клеток линии IPEC-J2 и эпителия кишки крысы. Его применение в наномолярной концентрации в клеточной линии IPEC-J2 приводит к изменению электрических параметров, которое проявляется в процессе формирования монослоя этих клеток. Влияние уабаина на барьерные свойства эпителия кишки крысы также подтверждается изменением его морфологии. Существенно, что одновременно происходит изменение уровня белков плотных контактов. В клетках линии IPEC-J2 происходит увеличение клаудина-1 и -5. В тонкой кишке – уменьшение клаудина-2 и -8; в толстой кишке – увеличение клаудина-1 и уменьшение клаудина-2. Иммуноцитохимически на линии клеток IPEC-J2 было подтверждено, что наблюдаемое изменение уровня белков происходит в области плотных контактов. Принимая во внимание установленный ранее вклад этих белков в межклеточную проницаемость, можно сделать вывод о том, что основное регулирующее действие уабаина связано с усилением барьерных свойств эпителия.

Этот вывод также подтверждается данными опытов по применению уабаина в условиях липополисахарид-индуцированного повреждения барьерных свойств эпителия на линии клеток IPEC-J2, а также в модели кишки крысы. Введение липополисахарида в среду инкубации клеток IPEC-J2 приводило к снижению сопротивления, которое сопровождалось уменьшением уровня белков плотных контактов, обеспечивающих непроницаемость

эпителия, – клаудина-1 и -3, что соответствует ранее проведенным исследованиям (Yan, Ajuwon, 2017). Введение липополисахарида крысам привело к развитию синдрома «дырявой кишки»: снижение ТЭС, изменение морфологии эпителия, увеличение межклеточной проницаемости для флуоресцентного макромолекулярного маркера. Молекулярные изменения в плотных контактах полностью соответствовали этому эффекту. В тонкой кишке ЛПС вызывал снижение клаудина-1 и клаудина-8, а также трицеллюлина. В толстой кишке – значительное повышение уровня клаудина-2.

Полученные в ходе комбинированного применения уабаина и ЛПС результаты дают основания считать, что применение уабаина перед ЛПС предотвращает нарушение барьерных свойств кишечного эпителия. На клетках линии эпителия IPEC-J2 предварительное их последовательное применение восстанавливает ТЭС до контрольных значений и восстанавливает уровень клаудина-1 и -3. 4-х дневное применение уабаина в модели ЛПС-индуцированной дисфункции эпителия кишки крысы влияет на величину тока «короткого замыкания», восстанавливает основные морфометрические показатели эпителия, нивелирует увеличение межклеточной проницаемости. В этих условия также отмечается восстановление уровня клаудинов и трицеллюлина к значениям близким по уровню в контрольной группе. Таким образом, длительное применение наномолярных концентраций уабаина оказывает помимо регулирующего действия также и протективное, обусловленное в первую очередь восстановлением уровня белков плотных контактов в условиях ЛПС-индуцированного нарушения функций кишечного эпителия.

Полученные результаты также позволили проанализировать возможные молекулярные механизмы сопряжения трансэпителиального и парацеллюлярного транспорта, в которые включены клаудины и Na, K-АТФаза. В первую очередь подтверждением возможности функционального сопряжения этих путей перемещения ионов и органических соединений через эпителий является изменение уровня белков плотных контактов при применении агониста Na,K-АТФазы уабаина. Известно, что белки плотных контактов образуют мультифункциональный комплекс и регулируются путем активации нескольких сигнальных путей, в том числе активацией cSrc-зависимого пути (Basuroy et al., 2003). В свою очередь Na,K-АТФаза связывает Src-киназу, ингибируя ее функцию. При этом добавление уабаина освобождает домен киназы и приводит к ее активации (Venugopal, Blanco, 2017). В опытах на линии клеток IPEC-J2 было обнаружено увеличение уровня активированной киназы Src при применении уабаина и изменение уровня клаудина-1 и -5, что может свидетельствовать о межмолекулярном взаимодействии белков плотных контактов и Na,K-АТФазы. Изменение различных белков плотных контактов в клеточной линии IPEC-J2, в тощей и толстой кишке

при действии уабаина подчеркивает специфичность и избирательность этого взаимодействия в различных объектах.

Таким образом, анализ полученных результатов свидетельствуют о том, что барьерные свойства эпителия кишки регулируются агонистом Na,K-АТФазы уабаином путем активации киназы Src пути и изменении уровня белков плотных контактов. Применение уабаина предотвращает дисфункцию эпителия при липополисахарид-индуцированном повреждении эпителия кишки.

ВЫВОДЫ

1. Уабаин регулирует барьерную функцию монослоя клеточной линии IPEC-J2, увеличивая уровень клаудина-1 и -5, а также активацию Src-киназы.
2. В клеточной культуре IPEC-J2 уабаин оказывает протективный эффект в отношении нарушения барьерных свойств при действии липополисахарида, предотвращая снижение трансэпителиального сопротивления и уровня клаудина-1 и -3.
3. Уабаин сегмент-специфически регулирует барьерную функцию тощей и толстой кишки крысы, уменьшая уровень клаудина-2 и -8 в тощей кишке и увеличивая уровень клаудина-1 в толстой кишке. Уменьшение диаметра крипт в тощей кишке и увеличение диаметра крипт в толстой кишке подтверждает данную избирательность действия уабаина.
4. Уабаин оказывает протективное действие in vivo, предотвращая нарушение барьерных свойств тощей и толстой кишки крысы, вызванное липополисахаридом, а именно, препятствует снижению клаудина-1, -8 и трицеллюлина в тощей кишке, увеличению клаудина-2 в толстой кишке, а также уменьшению глубины крипт данных сегментов.
5. Изменение уровня белков плотных контактов в эпителии кишки при действии лиганда Na,K-АТФазы уабаина свидетельствует о возможном функциональном взаимодействии этих молекулярных комплексов.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи по теме диссертации в рецензируемых журналах:

1. Федорова А.А., Кривой И.И., Марков А.Г. Низкие концентрации уабаина стимулируют формирование эпителиального барьера в линии клеток IPEC-J2 //Журнал эволюционной биохимии и физиологии. – 2019. – Т. 55. – №. 3. – С. 76-78.
2. Fedorova A.A. Cornelius V., Okorokova L.S., Krivoi I.I., Markov A.G., Amasheh S. Nanomolar ouabain stimulates epithelial barrier formation in IPEC-J2 cells //Acta Physiologica. – 2019. – Т. 227. – №. S719. – С. A 09-1.
3. Markov A.G., Vishnevskaya O.N., Okorokova L.S., Fedorova A.A., Kruglova N.M., Rybalchenko O.V., Aschenbach J.R., Amasheh S. Cholera toxin perturbs the paracellular barrier in

the small intestinal epithelium of rats by affecting claudin-2 and tricellulin //Pflugers Arch. - 2019. – T.471. - №.9. – C.1183-1189.

4. Markov A.G., Fedorova A.A., Kravtsova V.V., Bikmurzina A.E., Okorokova L.S., Matchkov V.V., Cornelius V., Amasheh S., Krivoi I.I. Circulating ouabain modulates expression of claudins in rat intestine and cerebral blood vessels //International journal of molecular sciences. – 2020. – T. 21. – №. 14. – C. 5067.

5. Kravtsova V.V., Fedorova A.A., Tishkova M.V., Livanova A.A., Vetrovoy O.V., Markov A.G., Matchkov V.V.. Krivoi I.I. Chronic Ouabain Prevents Radiation-Induced Reduction in the α2 Na,K-ATPase Function in the Rat Diaphragm Muscle //International journal of molecular sciences. – 2022. – T. 23. – №. 18. – C. 10921.

Тезисы докладов:

1. Федорова А.А., Дресслер Л. Уабаин предотвращает липополисахарид-индуцированное повреждение линии клеток IPEC-J2 //Фундаментальная наука и клиническая медицина. - 2022. - С. 535-536

2. Федорова А.А., Кривой И.И., Марков А.Г. Повышение уровня циркулирующего уабаина предотвращает снижение трансэпителиального сопротивления в тощей кишке крыс при моделировании эндотоксемии //National (All-Russian) conference on sciences and humanities–«Nauka SPbU–2020». – 2021.

3. Фальчук Е.Л., Окорокова Л.С., Федорова А.А., Amasheh S., Марков А.Г. Функциональные и молекулярные характеристики фолликул-ассоциированного эпителия Пейеровых бляшек как антигенного барьера кишечника //XXIII съезд Физиологического общества им. ИП Павлова с международным участием. – 2017. – С. 496-498.

4. Юдаева Е.С., Окорокова Л.С., Фатыйхов И.Р., Федорова А.А. Липополисахарид разрушает барьер фолликул-ассоциированного эпителия пейеровых бляшек при действии с базолатеральной стороны //Материалы XXV Всероссийской конференции молодых учёных с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины – 2019» - 2019. - С. 218-219.

5. Федорова А.А., Окорокова Л.С., Фальчук Е.Л. Липополисахарид усиливает барьерные свойства фолликул-ассоциированного эпителия Пейеровых бляшек //Материалы XXI Международной медико-биологической конференции молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина – человек и его здоровье». - 2018. - С. 446-447