Федеральное государственное бюджетное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет»

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

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель: д.б.н., проф. А.Г. Марков

Санкт-Петербург - 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ4
ВВЕДЕНИЕ
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ 12
1.1 Понятие о тканевых барьерах12
1.2 Плотные контакты - функциональная платформа18
1.3 Синергизм движения ионов и барьерные свойства
1.4 Векторность транспорта в эпителии34
1.5 Взаимодействие клаудинов и Na,K-АТФазы
1.6 Эндогенный уабаин как гормон
1.7 Нарушение кишечного барьера41
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ
2.1. Эксперименты с линией клеток IPEC-J246
2.1.1 Регистрация трансэпителиального сопротивления
2.1.2 Фармакологические агенты 46
2.1.3 Определение уровня белков плотных контактов методом Вестерн-блот .47
2.1.4 Иммуногистохимическое окрашивание парафиновых срезов для изучения локализации белков плотных контактов
2.1.5 Определение уровня cSrc-киназы методом Вестерн-блот
2.2 Эксперименты с животными
2.2.1 Регистрация электрофизиологических характеристик в камере Уссинга 55
2.2.2 Изучение проницаемости эпителия с помощью флуоресцеина натрия 56
2.2.3 Изучение морфологических изменений препаратов кишки крысы с помощью световой микроскопии
2.2.4 Определение уровня клаудинов методом Вестерн-блот 60
2.3 Статистическая обработка полученных результатов
ГЛАВА 3. БАРЬЕРНЫЕ СВОЙСТВА КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ IPEC-J2 ПРИ ДЕЙСТВИИ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА В УСЛОВИЯХ ДЛИТЕЛЬНОГО ПРИМЕНЕНИЯ УАБАИНА66
3.1 Изменение трансэпителиального сопротивления клеточной линии IPEC-J2 при действии липополисахарида в условиях длительного применения уабаина 66
условиях длительного применения уабаина

3.3 Изменение уровня Src-киназы и активированной Src-киназы в клеточной линии IPEC-J2 в условиях длительного применения уабаина
3.4 Изменение уровня белков плотных контактов в клеточной линии IPEC-J2 при действии липополисахарида в условиях длительного применения уабаина 72
3.5 Изучение локализации клаудинов в клеточной линии IPEC-J2 при действии липополисахарида в условиях длительного применения уабаина
ГЛАВА 4. БАРЬЕРНЫЕ СВОЙСТВА ТОЩЕЙ И ТОЛСТОЙ КИШКИ КРЫСЫ ПРИ ДЕЙСТВИИ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА В УСЛОВИЯХ 4-Х ДНЕВНОГО ПРИМЕНЕНИЯ УАБАИНА76
4.1 Изменение массы тела животных при действии ЛПС в условиях 4-х дневного применения уабаина
4.2 Изменение электрофизиологических параметров тощей и толстой кишки при действии ЛПС в условиях 4-х дневного применения уабаина
4.3 Изменение проницаемости тощей и толстой кишки крысы при действии ЛПС в условиях 4-х дневного применения уабаина
4.4 Морфология эпителия тощей и толстой кишки крысы при действии липополисахарида в условиях 4-х дневного применения уабаина
4.5 Изменение уровня белков плотных контактов тощей и толстой кишки крысы при действии липополисахарида в условиях 4-х дневного применения уабаина. 90
ОБСУЖДЕНИЕ95
ВЫВОДЫ
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АМП антимикробные пептиды
- кДа килодальтон
- ЛПС липополисахарид
- PVDF поливинилденфторид
- ТЭС трансэпителиальное сопротивление
- ЭДТА этилендиаминтетрауксусная кислота

Caco-2 - эпителиальные клетки аденокарциномы толстой кишки (human epithelial colorectal adenocarcinoma cells)

- EGFR рецептор к эпидермальному фактору роста
- Ig иммуноглобулин
- IL интерлейкин
- LAК лимфокин-активируемые киллеры
- LBP –ЛПС-связывающий белок

MAGUK – мембран-связанные гуанилат киназы (membrane-associated guanylate kinase)

- MD-2 белок миелоидной дифференцировки-2
- MDCK клетки Майдин-Дэрби почек собак (Madin-Darby canine kidney)
- MHC главный комплекс гистосовместимости (major histocompatibility complex)
- NF-кВ ядерный фактор-каппа-В
- NLRs нуклеотид-связывающие рецепторы, подобные домену олигомеризации

PAMPs – патоген-ассцоиированные молекулярные паттерны (pathogen-associated molecular patterns)

- PBS phosphate buffer saline фосфатный буфер
- PRR паттерн-распознающие рецепторы (pattern recognition receptors)

RELMβ - резистин-подобная молекула-бета

RLRs - рецепторы подобного гена-1, индуцибельные ретиноевой кислотой

SDS – sodium dodecyl sulfate- додецилсульфат натрия

Src – протоонкогенных тирозиновая киназа

TAMP - белки Марвел, ассоциированные с плотными контактами (tight-junction associated Marvel protein)

 $TBS-TRIS-buffer\ saline- Трис\ буфер$

TLR – толл-подобный рецептор

ZIМ - ZO-1-взаимодействующий мотив

ZO – зонула окклюденс

ВВЕДЕНИЕ

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 апиколатеральной 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 органических участвуют для молекул 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-ATФаза, 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-ATФазы 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., 2015а; Rajamanickam et al., 2017а). Однако исследования

вклада Na, К-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 залачей 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
- Определение уровня и локализации белков плотных контактов методом Вестернблот 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
- 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, сегментспецифически 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 cSrcкиназу. 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 биологическом факультете Санкт-Петербургского на 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 Вестернблота. 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 Сьезде немецкого физиологического общества (г. Ульм, Германия), XXIII Сьезде 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-ATФазы 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.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Понятие о тканевых барьерах

Фундаментальной задачей современной физиологии висцеральных систем является изучение структур и процессов, которые обеспечивают создание и поддержание постоянства внутренней среды. Тканевые барьеры в организме человека и животных являются важнейшим элементом, обеспечивающим выполнение данных процессов. Они представляют собой, главным образом, эпителиальные ткани, формирующие единый структурно-функциональный пласт клеток, механически сопряженных между собой. К основным функциям тканевых барьеров относится, в первую очередь, компартментализация и селективный транспорт макромолекул и ионов, приводящий к созданию различных градиентов, а также предотвращение проникновения патогенов во внутреннюю среду организма. Понимание механизмов того, каким образом тканевые барьеры обеспечивают поддержание ионного и антигенного гомеостаза в организме, является актуальной задачей в настоящее время.

На сегодняшний день на структурно-функциональной основе выделяют несколько видов тканевых барьеров в организме: эпителий, выстилающий полости внутренних органов, различные виды гистогематических барьеров такие как гематотестикулярный или гематоэнцефалический барьер, а также эпидермис кожи (Scalise et al., 2021).

Одним из крупнейших тканевых барьеров в организме человека и животных является кишечник. Эпителий кишечника подвержен постоянной антигенной нагрузке за счет наличия в химусе вирусов, бактерий, а также аллергенов, взаимодействие с которыми может привести к дисфункции пищеварительной системы, а также к развитию различных воспалений и аллергий (Borovik et al., 2013; Sánchez de Medina et al., 2014). Функционирование кишечника в качестве тканевого барьера возможно благодаря нескольким основополагающим элементам: секреция слизи, антимикробных пептидов, секреторного IgA, присутствие комменсальной микробиоты, наличие специализированной иммунной системы, а также регуляция целостности клеточного пласта и наличие избирательного транспорта, которые обеспечиваются различными межклеточными контактами.

Тканевой барьер слизистой оболочки кишечника - это многокомпонентная динамическая система. Внешний слизистый слой предотвращает проникновение патогенов во внутреннюю среду и состоит из муцина – высокомолекулярного содержащего кислые Муцин синтезируется гликопротеина, полисахариды. бокаловидными и эпителиальными клетками кишечника, и образует структуру наподобие сетки, покрывающую эпителий (Liévin-Le Moal, Servin, 2006). Слои муцина обеспечивают не только облегчают передвижение пищевого комка, но и создают первичную защиту организма от эндо- и экзогенных раздражителей, а также выполняют противомикробную функцию, при этом не нарушая транспорт питательных веществ (Hilkens et al., 1992). Нарушение целостности этого слоя, а также изменение синтеза муцина может привести к острым воспалительным заболеваниям, а также кишечной ишемии и разрушению эпителиальных клеток (Corfield et al., 2001; Chang et al., 2012). Бокаловидные клетки, помимо муцина, секретируют другие биологически активные молекулы, такие как фактор трилистника, который облегчает перекрестное связывание муцина и способствует восстановлению эпителия, резистин-подобную молекулу-бета (RELMβ) и Fc-гаммасвязывающий белок (Fcgbp), которые также являются структурными компонентами слизистого слоя и принимают участие в защите кишечника (Kim, Ho, 2010). Недавние исследования также показали, что бокаловидные клетки могут выступать в качестве антиген-презентирующих, доставляя антигенный материал из просвета нижерасположенным дендритным клеткам (McDole et al., 2012).

В слизистой оболочке обнаруживается другой элемент защиты – антимикробные пептиды (АМП), которые секретируются клетками Панета, расположенными на дне крипт кишечника. АМП активны в отношении различных организмов, включая грамположительные и грамотрицательные бактерии, паразиты, микроскопические грибы и оболочечные вирусы (Kaiser, Diamond, 2000). Антимикробные пептиды играют важную роль в реализации врожденного иммунного ответа, что приводит к быстрому реагированию на патоген, до того момента, как адаптивная иммунная система будет достаточно мобилизована. Дефенсины являются наиболее изученным семейством АМП. Их защитный механизм нацелен на поверхностную мембрану бактерий, в которую они способны встраиваться, образуя поры, что приводит к увеличению проницаемости мембраны и лизису микроорганизма (Liévin-Le Moal, Servin, 2006).

В слоях слизи дополнительную защиту обеспечиваютиммуноглобулины, секретируемые В-клетками собственной пластинки слизистой. Иммуноглобулины, главным образом секреторный иммуноглобулин А (IgA), является основным элементом гуморального иммунного ответа, который совместно с системой врожденного иммунитета в слизистых оболочках обеспечивает защиту от микробных антигенов на поверхности слизистого эпителия (Suzuki et al., 2010). IgAответы инициируются в организованных индуктивных сайты, таких как Пейеровы бляшки кишечника, а также в диффузных эффекторных сайтах – собственной пластинке слизистой оболочки кишечника (Macpherson et al., 2008). Основными функциями IgA является связывание с патогеном и его нейтрализация, а также он играет решающую роль в регулировании состава микрофлоры кишечника (Fagarasan, Honjo, 2004).

В желудочно-кишечном тракте человека содержится около 100 триллионов бактерий, поэтому исследователи все чаще выделяют кишечную микробиоту в качестве еще одного элемента барьера, который помогает в переваривании и ферментации пищи, что может быть важно для производства определенных витаминов, также играет важную роль в защите от патогенов, конкурируя за питательные вещества с патогенными микроорганизмами и выделяя АМП (Pushpanathan et al., 2019). Было показано, что микробиота кишечника может модулировать костный мозг и селезенку для продукции цитокинов макрофагами в дифференциальной форме. В частности, усиление производства интерлейкина-12 в селезенке, который участвует в регулировании уровня ответов Th1 и Th2, играет ключевую роль в защите организма от внутриклеточных микроорганизмов (Nicaise et al., 1999). Недавние эксперименты, проведенные на стерильных (лишенных микробиоты) животных, показали, что колонизация микробиотой в раннем возрасте необходима для оптимального развития иммунной системы. В отсутствие микробиоты иммунитет слизистой оболочки кишечника недоразвит, и у животных обнаруживаются более мелкие мезентериальные лимфатические, уменьшен размер пейеровых бляшек и снижено количество иммунных клеток, таких как IgAпродуцирующие приводит нарушению плазматические клетки, что К

функционирования кишечника в качестве эпителиального барьера (Alarcón et al., 2016).

Таким образом, сбалансированные и динамичные взаимодействия между слизистыми слоями, эпителиальными клетками кишечника, микрофлорой и иммунной защитой хозяина играют важную роль в поддержании нормального функционирования кишечника в качестве тканевого барьера.

Еще одним важным элементом эпителиального барьера кишечника является парацеллюлярный барьер, функционирование которого в сохранении антигенного гомеостаза на данный момент до конца не изучено. Имеются данные литературы о что проникновение некоторых патогенов в организм возможно по TOM. парацеллюлярному пути или сопровождается изменением его барьерных свойств (Balkovetz, Katz, 2003). Известно, что Campylobacter jejuni, классический зоонозный патоген из микрофлоры птиц и некоторых животных, обладает протеолитической активностью к Е-кадгерину и тем самым, возможно, способствует нарушению функционирования межклеточного барьера в целом (Boehm et al., 2012). Кроме того, было показано, что гемагглютинин-протеаза, продуцируемая холерным вибрионом, изменяет морфологию и реорганизует белок плотных контактов 3О-1, а также Fактин цитоскелета, тем самым нарушая барьерную функцию всего комплекса (Wu et al., 2000). Инфицирование патогеном Pseudomonas fluorescens способствует увеличению парацеллюлярной проницаемости, и при определенных условиях может привести к хроническому воспалению в кишечнике (Alnabhani et al., 2015).

Парацеллюлярный путь представлен некоторыми межклеточными контактами, элементы которых обеспечивают взаимодействие клеток друг с другом. Для понимания механизмов регуляции и функционирования тканевых барьеров необходимо изучение особенностей функций, строения и регуляции межклеточных соединений.

В настоящее время выделяют четыре типа таких контактов, функции которых связаны не только с механическим соединением клеток, но и в обеспечении различных процессов внутриклеточного сигналинга, регуляции структурной целостности тканей, а также в поляризации клеточного пласта. Каждый тип соединения обладает своим собственным уникальным молекулярным составом, определенной локализацией в клетке и выполняет различные функции. Нарушение

в функционировании любого из видов межклеточных контактов в эпителиальном барьере может приводить к различного рода дефектам развития и широкому спектру заболеваний, что подчеркивает важность их нормального функционирования (Garcia et al., 2018). К межклеточным соединениям относят плотные контакты, щелевидные контакты, десмосомы и адгезионные контакты. Роль десмосом в тканевых барьерах заключатся главным образом в том, чтобы обеспечивать прочное механическое сопряжение клеток и структурную целостность эпителия. С точки зрения тканевых барьеров, десмосомы играют важную роль в поддержании механической прочности эпидермиса кожи и обнаруживаются во всех слоях эпидермиса, кроме рогового слоя, при этом в эпителии кишечника их функции изучены недостаточно. Десмосомы содержат трансмембранные кадгерины двух подтипов - десмоглеин и десмоколлин. Члены семейства лесмосомных кадгеринов экспрессируются во всех стратифицированных слоях эпидермиса (Getsios et al., 2004; Nekrasova, Green, 2013), но в разных комбинациях. Их дифференциальная экспрессия может придавать различную силу адгезии, характерную для разных слоев (Chidgey et al., 2001; Merritt et al., 2002; Garrod, Chidgey, 2008). Например, в присутствии внеклеточного Ca²⁺ десмосомы образуют относительно слабое межклеточное сцепление, подобное кадгеринам в адгезионных контактах, но со временем десмосомы становятся Ca²⁺ независимыми и образуют более сильное сопряжение (Kimura et al., 2007; Tariq et al., 2015). Нарушение любой части десмосомального комплекса приводит к ломкости, образованию пузырей и, в крайних случаях, отторжению всего эпидермиса (Kottke et al., 2006; Haines, Lane, 2012; Broussard et al., 2015). Место поражения в эпидермисе зависит от того, какой десмосомальный кадгерин разрушен. Например, потеря десмоглеина 3, расположенном в базальном слое, у пациентов с обыкновенной пузырчаткой приводит к отслоению базальных слоев эпидермиса от дермы, что может привести к летальному исходу (Amagai et al., 1991; Koch et al., 1997). Адгезионные контакты поддерживают межклеточную адгезию, регулируют организацию нижележащего актинового цитоскелета и формируют центр для передачи клеточных сигналов и регуляции транскрипции различных генов (Takeichi, 2014). Основными трансмембранными белками в данном типе межклеточных контактов являются классические кадгерины, такие как Е-кадгерин. Было показано, мутации Е-кадгерина что вызывают рак желудочно-кишечного тракта.

Наследственный рак желудка возникает в результате мутации зародышевой линии гена Е-кадгерина с дополнительным соматическим подавлением второго аллеля Е-кадгерина путем метилирования промотора ДНК (Humar, Guilford, 2009). Исследования in vivo и in vitro выявили важность адгезионных контактов в регуляции важнейших гомеостатических процессов в эпителии кишечника, таких как формирование щеточной каймы, клеточная миграция и пролиферация клеток (Hermiston, Gordon, 1995; Hermiston et al., 1996). Для того, чтобы эпителиальный слой мог функционировать как тканевой барьер, помимо механического сцепления между клеток и их взаимодействия друг с другом необходимо обеспечить в нем избирательную проницаемость по межклеточному пути. В наличии такого парацеллюлярного барьера как для ионов, так и для макромолекул основную роль играет комплекс плотных контактов, расположенный во всех эпителиальных тканях организма (Günzel, Fromm, 2012).

Первые исследования, посвященные плотным контактам, были проведены еще в 1963 году, когда стали доступны техники ультраструктурного анализа. Было показано, что в различных эпителиальных препаратах слияние участков мембран соседних клеток, описанное авторами как замыкающий контакт (zonula occludens), приводило к полному закрытию парацеллюлярного пути на электронных фотографиях в этой области (Farquhar, Palade, 1963). Более того, используя витальные красители и различные электрон-непрозрачные маркеры, установили, что именно плотные контакты ограничивают межклеточный транспорт между полостью органов и субэпителиальным слоем, а не десмосомы, как ранее предполагалось (Farquhar, Palade, 1963). Использование техники замораживания-скалывания позволило в дальнейшем установить, что плотные контакты представляют собой единую непрерывную сеть из адгезионных частиц, которая пронизывает всю ткань (Eakin, Westfall, 1964). Проведенные позже исследования с использованием различных фиксаторов показали, что фибриллярные нити комплекса плотных контактов имеют белковую природу (Kachar, Reese, 1982). Подтверждение данной гипотезы было получено в работе на линии клеток MDCK (Madin-Darby canine kidney; клеточная линия почки собаки Майдин-Дэрби) с использованием различных белковых ингибиторов, которые препятствовали формированию нормального трансэпителиального сопротивления (Griepp et al., 1983), при этом применение растворителя липидных молекул не влияло на структурные изменения комплекса плотных контактов (Stevenson, Goodenough, 1984). Дальнейшие исследования заключались в непосредственном изучении молекулярного состава комплекса, поскольку понимание роли плотных контактов в обеспечении гомеостаза организма было до конца не выясненным.

1.2 Плотные контакты - функциональная платформа

Первым идентифицированным элементом в комплексе плотных контактов был внутриклеточный белок зонула окклюденс-1 (30-1, zonula occludens-1). 30-1 представляет собой адаптерный элемент, основной функцией которого является обеспечение взаимосвязи комплекса плотных контактов и цитоскелета клетки (Siliciano, Goodenough, 1988). Дальнейшие исследования были направлены на определение трансмембранных белков, поскольку предположили, что только внутриклеточные элементы не способны сформировать полноценный межклеточный барьер. Используя метод выделения мембранной фракции белков, получили антитела к следующему белку комплекса плотных контактов - окклюдину (Furuse et al., 1993). Окклюдин - четырехдоменный трансмембранный белок с молекулярной массой ~ 65 кДа, который, как предполагалось ранее, мог неспосредственно участвовать в формировании парацеллюлярного барьера (Cummins, 2012). Исследования, проведенные с трансфекцией кДНК окклюдина клеточной линии, не способной первоначально формировать плотные контакты, приводило к синтезу данного белка с образованием структуры, идентичной комплексу плотных контактов (Furuse et al., 1996). После данных экспериментов было предположено, что окклюдин и является основным структурным элементом комплекса плотных контактов. Однако позднее было показано, что нокауты мышей по окклюдину не только выживали после рождения, что было бы невозможным в виду нарушения функционирования эпителиальных барьеров, но и имели в эпителии структуру, типичную для комплекса плотных контактов (Saitou et al., 1998). Данное исследование являлось подтверждением того, что помимо окклюдина существуют другие белки плотных контактов, чья роль является решающей в формировании и полноценном функционировании данного комплекса белков. В ряде последующих исследований были идентифицированы два других белка - клаудин-1 и клаудин-2 первые белки семейства клаудина. Как и окклюдин, клаудины имели четырехдоменную структуру, однако по сравнению с окклюдином, имели абсолютно иную аминокислотную последовательность (Furuse et al., 1998). Ранее эти белки в литературе были описаны как рецепторы для поражающего желудочнокишечный тракт энтеротоксина Clostridium perfingens (Katahira et al., 1997).

В настоящее время в комплексе белков плотных контактов идентифицировано более 40 белков, которые подразделяют на внутриклеточные и трансмембранные белки. Первые связывают плотные контакты с актиновым цитоскелетом и/или выполняют регуляторные функции. Последние отвечают за взаимодействие между соседними клетками и, таким образом, напрямую обеспечивают барьерную функцию плотных контактов.

К внутриклеточным (адаптерным) белкам относят ранее упомянутый 3О-1, а также 3О-2, -3, MAGI-1, -2, -3, MUPP-1, Par3 и ряд других белков, которые являются эелементами семейства белков мембран-связанных гуанилат киназ, или MAGUK (González-Mariscal et al., 2008). Эти белки взаимодействуют с трансмембранными элементами комплекса в основном посредством взаимодействия с их PDZ-доменами (Stiffler et al., 2007). PDZ-домены обеспечивают межбелковое взаимодействие благодаря связыванию PDZ-домена одного белка с PDZ-мотивом другого белка. Возможны и другие варианты взаимодействия белков. Так, цитозольный белок цингулин, входящий в состав комплекса плотных контактов, не содержит PDZ-доменов, но взаимодействует с ZO-1 через N-конец ZO-1-взаимодействующего мотива (ZIM) (Fanning et al., 1998). Адаптерные белки ZO-1, -2, -3 и цингулин связываются напрямую с F-актином (Guillemot, Citi, 2006). Цингулин также связывается с немышечным миозионом, и, таким образом, закрепляет комплекс плотных контактов в цитоскелете (Cordenonsi et al., 1999).

По количеству трансмембранных участков интегральные мембранные белки комплекса плотных контактов подразделяют на три группы (Ebnet, 2008). Первая группа включает белки, имеющие один трансмембранный участок. К ним относят адгезионную молекулу комплекса JAM, гомолог белка крамб (Crb3, crambs protein homolog), рецепторы коксаки-вируса и аденовируса (CAR) (Lemmers et al., 2004; Mandell, Parkos, 2005; Coyne, Bergelson, 2005). Вторая группа - белки, имеющие три трансмембранных участка, к которым относят субстанцию эпикардиальных кровеносных сосудов (bves, blood vessel epicardial substance) (Russ et al., 2011). И

третья крупнейшая группа интегральных белков комплекса плотных контактов — белки, имеющие четыре трансмембранных домена. Эта группа включает в себя семейство клаудина и семейство TAMP (Günzel, Fromm, 2012). Из всех интегральных белков плотных контактов именно белки с четырьмя трансмембранными доменами являются основными молекулярными компонентами плотных контактов, которые определяют транспорт по парацеллюлярному пути.

Роль JAM-семейства (JAM-A, -B, -C), Crb3, CAR и Bves на сегодняшний день до конца не ясна. За исключением Crb3, все эти белки способны взаимодействовать в цис- и в трансположениях. Сверхэкспрессия этих белков или ее полное подавление влияет на межклеточную проницаемость (Lemmers et al., 2004; Mandell, Parkos, 2005; Coyne, Bergelson, 2005; Russ et al., 2011). Однако, как оказалось, этот эффект являлся следствием изменения экспрессии различных членов семейства белка клаудина. Для всех этих белков предполагают наличие регуляторных функций (Severson, Parkos, 2009; Vetrano, Danese, 2009).

Для белков семейства TAMP (tight-junction associated Marvel protein – белки Марвел, ассоциированные с плотными контактами) характерно наличие в своей структуре домена Марвел, который, может играть важную роль во взаимодействии между белками и формировании мембранных белковых комплексов (Sánchez-Pulido et al., 2002). К семейству ТАМР относят три белка: вышеупомянутый окклюдин, а также открытые сравнительно недавно белки трицеллюлин (также известный как Марвел D2) и Марвел D3 (Raleigh et al., 2010; Piontek et al., 2011). Белки семейства ТАМР обнаружены во всех плотных контактах по всему организму. Взаимодействие с белками цитоскелета происходит через ZO-1 для окклюдина и трицеллюлина, тогда как MarvelD3 связывается только с другими членами семейства TAMPs (Raleigh et al., 2010). Предполагается, что белки данного семейства играют роль в обеспечении барьерных свойств эпителия, однако вклад каждого белка в настоящее время до конца не выяснен. Так, у мышей, нокаутированных по окклюдину, не наблюдалось достоверного изменения транспителиального сопротивления эпителия желудка и тонкой кишки, однако у таких животных была отмечена задержка в росте и наличие на гистологическом уровне всех признаков хронического атрофического гастрита (Van Itallie et al., 2010). Напротив, сверхэкспрессия окклюдина увеличивала трансэпителиальное сопротивление в линии клеток почки собаки MDCK II. Таким

образом, предполагается, что окклюдин может усиливать эпителиальный барьер, но при его дефиците другие белки комплекса плотных контактов могут компенсировать его функции (явление, известное как избыточность замещения). Основной особенностью трицеллюлина является формирование контакта одновременно между тремя клетками, в то время как окклюдин и другие трансмембранные представители плотных контактов, включая белки семейства клаудина, участвуют в организации между двумя клетками (Ikenouchi et al., 2005). Кроме того, было показано, что мутация по трицеллюлину вызывает глухоту во внутреннем ухе (Riazuddin et al., 2006), в то время как его сверхэекспрессия снижает проницаемость для макромолекул между тремя клетками. При этом выраженная сверхэкспрессия трицеллюлина снижает проницаемость и для ионов, мигрируя в бицеллюлярные плотные контакты (Krug et al., 2009). Таким образом, предполагается, что физиологических условиях регулирует, главным трицеллюлин в образом, проницаемость для контактов между тремя клетками. В 2009 году был открыт третий член семейства ТАМР - белок марвел D3, который, как и окклюдин, функционирует в бицеллюлярных контактах. Подавление синтеза Марвел D3 в клеточных линиях с использованием малых интерферирующих РНК не приводило к выраженным структурным изменениям всего комплекса, однако вызывало увеличение проницаемости для ионов без изменения проницаемости для макромолекул (Steed et al., 2009).

Таким образом, специфическая роль белков семейства ТАМР и их влияние на барьерные свойства эпителия остаются до конца не выясненными. Вместе с тем по имеющимся литературным данным основную роль в формировании и поддержании барьерных свойств эпителия отводят белкам семейства клаудина - второму семейству интегральных белков плотных контактов с четырьмя доменами (Günzel, Fromm, 2012; Марков, 2013).

В последние годы было показано, что у млекопитающих экспрессируется 27 белков семейства клаудина с молекулярной массой от 22 до 25 кДа (Mineta et al., 2011). В отличие от этого, у рыб и земноводных количество элементов данного семейства достигает 56 (Loh et al., 2004). Функционально клаудины являются важнейшими компонентами комплекса плотных контактов, о чем свидетельствуют многочисленные работы по исследованию нокаутов и/или сверхэкспрессии белков

данного семейства (Furuse et al., 1999; Kausalya et al., 2006; Markov et al., 2010). Практически все клаудины являются продуктом экспрессии собственного гена, однако некоторые представители данного семейства (например, клаудина-10 и -19) имеют по два варианта в результате альтернативного сплайсинга, что вносит вклад в их различные селективные свойства (Van Itallie, Anderson, 2006).

Структурно клаудины представляют четырехдоменные трансмембранные белки с двумя внеклеточными петлями (ECL1,2 - extracellular loop 1,2) и С- и Nвнутриклеточными концами (Furuse et al., 1999). Большинство клаудинов обладают С-концевыми PDZ-сайтами (Stiffler et al., 2007). По данным литературы предполагается, что функция всех трансмембранных белков плотных контактов с доменами определяется, главным образом, четырьмя именно ИХ ДВУМЯ внеклеточными петлям. Более крупная, ECL1, определяет свойства межклеточного барьера или селективного канала. Напротив, ECL2, вероятнее всего, имеет решающее значение для сцепления и удержания противоположных латеральных клеточных мембран (Krause et al., 2008). Филогенетическая классификация клаудинов по гомологии аминокислотных последовательностей привело к разделению клаудинов на "классические" (клаудины -1-10, -14, -15, -17 и -19) и "неклассические" (клаудины 11–13, -16, -18 и -20–27) в соответствии со степенью сходства их последовательностей (Loh et al., 2004; Mineta et al., 2011).

Наиболее коротким участком клаудинов является N-внутриклеточный домен, в то врем как C-конец является наиболее вариабельным по своей длине участком от 21 до 106 аминокислот у разных представителей данного семейства (Hewitt et al., 2006). Через PDZ-сайты на карбоксильном конце клаудинов реализовывается взаимодействие с цитоскелетом клетки через адаптерные белки. Кроме того, Cконец клаудинов содержит сайты для фосфорилирования, за счет которого регулируется их функционирование, и, как следствие, свойства всего комплекса плотных контактов (González-Mariscal et al., 2008). Наряду с этим процесс фосфорилирования одних клаудинов необходим для их миграции и встраивания в комплекс, в то время как фосфорилирование других представителей этот процесс, напротив, предотвращает (Ikari et al., 2006).

Отдельные клаудины вносят неоднозначный вклад в функционирование комплекса плотных контактов в разных модельных объектах, а именно: либо

увеличение, либо снижение проницаемости, ЧТО может быть объяснено взаимодействием разных клаудинов в более крупных функциональных единицах кластерах (Markov et al., 2015). В этом контексте кластеры с определенными комбинациями различных клаудинов, взаимодействующих в цис- и/или трансконфигурациях, могут объяснить совместную локализацию этих белков и связанные с этим функциональные особенности. В то время как цис-взаимодействие будет связано с клаудинами в мембране в пределах одной клетки (бок о бок), трансвзаимодействие будет описывать связывание с предполагаемым мультимером соседней клетки (голова к голове) (Furuse et al., 1999). Между двумя разными клетками клаудины способны вступать в гомофильное (клаудин-1 — клаудин-1) и гетерофильное (клаудин-1 — клаудин-3) взаимодействия. Считается, что ключевую роль в гомотипичном взаимодействии играют аминокислотные остатки в центре второй внеклеточной петли клаудинов (Daugherty et al., 2007). Таким образом, клаудины могут взаимодействовать, располагаясь как в пределах одной клеточной мембраны (цис-взаимодействие), так и с клаудинами, которые локализованы на противоположных клетках (транс-взаимодействие). Вступать в цис-взаимодействие способны только определенные типы клаудинов, например клаудин-2, -3 и -5 (Coyne et al., 2003).

Таким образом, именно наличие разных по аминокислотному составу внеклеточных петель у клаудинов и определяет их взаимодействие, а также совместимость с другими белками, что в свою очередь может приводить к ионселективной избирательности плотных контактов. Такая сложная мозаика взаимодействия клаудинов может объяснять различную проницаемость эпителиев в тканях разных органов, а также в пределах одного и того же органа.

В 2015 году была предложена модель клаудиновых кластеров, образованных шестью клаудинами одной клетки и противостоящими шестью клаудинами соседней клетки (Markov et al., 2015). Данная модель позволяет интерпретировать компенсаторные функции клаудинов, исследуемых в контексте моделей нокаута и нокдауна, так как отдельные функции различных членов семейства клаудина в определенных кластерах могут обеспечивать адгезию и целостность этих структур в результате транс-взаимодействия. Было показано, что у мышей, нокаутированных по клаудину-4, нефроны показали сопутствующее уменьшение клаудина-8; однако

наряду с этим наблюдалась увеличение экспрессии клаудина-3, что указывало на компенсаторную регуляцию, при этом общая структура комплекса плотных контактов не изменялась (Fujita et al., 2006). Исследование механизмов взаимодействия клаудинов друг с другом является перспективной задачей для направленной доставки фармакологических агентов и лекарств через эпителиальные барьеры (Protze et al., 2015). Но для разработки и применения таких подходов необходимым является изучение спектра клаудинов, экспрессируемых в ткани, а также их локализации.

Использование метода замораживание -скалывание позволило установить, что более проницаемые эпителии характеризуются комплексом плотных контактов, практически всегда состоящим из 1 нити, при этом структура плотных контактов уплотненных, непроницаемых эпителиев представляет собой сеть из более чем 5 нитей (Claude, Goodenough, 1973). Диаметр нитей комплекса плотных контактов, визуализированных с помощью электронной микроскопии после проведения замораживания-скалывания составлял приблизительно 10 нм. Было предположено, что гексамерная олигомеризация клаудинов с цис-взаимодействием, по-видимому, наиболее вероятна по аналогии с сопоставимыми размерами гексамерного строения коннексинов, образующих щелевые контакты, которые имеют соизмеримую молекулярную массу и аналогичные размеры (Saez et al., 2003).

Предполагается, что барьерные свойства в разных типах эпителиев определяются не столько количеством нитей и сложностью строения комплекса, сколько свойствами отдельных его элементов, которые невозможно было изучить с помощью электронной микроскопии (Colegio et al., 2002). Дальнейшие исследования показали, что в различных тканях экспрессируется специфичный для этой ткани спектр клаудинов, изменения в котором приводят к изменениям барьерных характеристик эпителия. По данным литературы о функциональном вкладе клаудинов в эпителиальный барьер и транспорт в нативной ткани была получена корреляция экспрессии различных представителей семейства клаудина, связанная с функциональными параметрами ткани, такими как селективная межклеточная проницаемость в различных органах, анализ наследственных заболеваний, а также нокаут-исследования (Furuse et al., 2001; Kausalya et al., 2006). Так, например, в исследованиях, посвященных физиологической роли клаудинов в различных

органах, был представлен комбинированный анализ барьерной функции с соответствующими пулами экспрессии клаудинов вдоль продольной оси желудочно-кишечного тракта (Markov et al., 2010). В этом исследовании было показано, что специфичные для сегмента барьерные свойства могут быть приписаны специфической экспрессии клаудинов в соответствующих сегментах: для верхних отделов тонкой кишки характерен пул из клаудинов, обеспечивающих более проницаемые барьерные свойства, в то время как для толстой кишки пул экспрессируемых клаудинов сменяется белками, непроницаемыми для ионов и макромолекул, создавая более плотную и герметичную структуру (Марков, 2013).

Кроме того, при изучении уровня отдельных клаудинов в ткани необходимо отметить, что в результате процессов их фосфорилирования и дефосфорилирования, представители данного семейства могут локализовываться вне комплекса плотных контактов в пределах клеточной мембраны. Для некоторых представителей отмечается локализация и в апикальном, и базолатеральном доменах клетки (Blackman et al., 2005). Помимо этого, для клаудина-1 отмечается локализация в цитоплазме и внутри ядра, однако его роль при таком расположении остается неясной. Предполагается, что в таком виде он может участвовать в процессах внутриклеточного сигналинга и регуляции экспрессии генов (Linares et al., 2012).

Тем не менее, учитывая, что основной функцией белков семейства клаудинов является формирование межклеточного селективного барьера, современные исследования направлены на изучение роли отдельных представителей семейства в этом процессе. Важную роль для данного типа исследований сыграли эксперименты с частичным или полным подавлением экспрессии отдельных клаудинов, а также с изменением их уровня в клетках. Один из подходов к классификации белков семейства клаудинов основан на физиологических свойствах. В основе данной классификации лежит изменение проницаемости эпителия для ионов. Увеличение проницаемости связывают в настоящее время с наличием порообразующих клаудинов, а снижение - с клаудинами, которые усиливают барьерные свойства эпителия (Марков, 2013). На основании последних научных данных клаудины на три группы: понижающие проницаемость принято делить эпителия, увеличивающие проницаемость, или пороформирующие, и белки с непостоянной функцией (Günzel, Fromm, 2012; Krug et al., 2012; Марков, 2013).

Определение проницаемости было получено благодаря измерению электрического сопротивления. «Плотные» эпителии характеризуются высоким сопротивлением из-за низкой парацеллюлярной и высокой трансцеллюлярной проницаемости. Кроме того, пассаж макромолекул по межклеточному пути является довольно низким (Schultz, 1972). При этом в проницаемых эпителиях, таких как проксимальный каналец почки и тонкая кишка, парацеллюлярная проницаемость, напротив, выше, чем трансцеллюлярная. Такие эпителии демонстрируют более высокие скорости абсорбционного транспорта без значительных градиентов концентрации (Amasheh et al., 2011а). Уплотняющими белками плотных контактов являются клаудин-1, -3, -5, -11, -14 и -19, функция которых была исследована в экспериментах с нокаутными животными. Роль клаудина-1 была определена одной из первых. Мыши, нокаутированные по клаудину-1, умирали сразу после рождения в результате обезвоживания и дефектов кожного барьера (Furuse et al., 2002). У человека мутации клаудина-1 приводили к ихтиозу (Tokumasu et al., 2017). Дальнейшие экспериментальные доказательства функциональной роли клаудина-1 были получены в экспериментах с клеточной линией MDCK II с низким электрическим сопротивлением, которых сверхэкспрессия В клаудина-1 увеличивала сопротивление примерно в четыре раза и, кроме того, способствовала снижению проницаемости для молекул декстрана массой 4 кДа (Inai et al., 1999). Помимо роли клаудина-1 в формировании непроницаемости барьера, было подробно изучено его взаимодействие с другими белками плотных контактов, в частности, в неэкспрессирующей какие-либо компоненты плотных контактов линии фибробластов NIH/3T3. Трансфекция этой линии кДНК клаудина-1 приводила к сборке плотных контактов, однако сопротивление и проницаемость не изменялись. В то же время коэкспрессия клаудина-1 с клаудином-3 в этих экспериментах как достоверно увеличивала сопротивление клеточной линии, так и снижала проницаемость для макромолекул (Coyne et al., 2003). В линии клеток желудка нокаут по клаудину-3 приводил к значительному снижению трансэпителиального сопротивления (Hashimoto et al., 2008). Хотя в эпителии с низким сопротивлением клаудин-3 проявляет определенные уплотняющие свойства, он не является полностью непроницаемым, поскольку в экспериментах с альвеолярными клетками, которые образуют эпителий с высоким сопротивлением, сверхэкспрессия клаудина-

3 значительно снижает трансэпителиальное сопротивление (Mitchell et al., 2011). Вероятнее всего, клаудин-1 и клаудин-3 представляют собой минимум для формирования комплекса плотных контактов, потому что только их коэкспрессия приводила к образованию функционального барьера (Coyne et al., 2003). Роль другого представителя данной группы клаудинов – клаудина-5 – неоднозначна. Клаудин-5, как было показано ранее, является основным белком в комплексе плотных контактов гематоэнцефалического барьера. Мыши, нокаутированные по клаудину-5, страдали дефектами кожного и гематоэнцефалического барьера, и погибали в течении суток после рождения (Nitta et al., 2003). Кроме того, его нокаут эндотелиальных клеток мозга вызывал достоверное снижение на ЛИНИИ трансэпителиального сопротивления (Koto et al., 2007). При этом делеция в гене клаудина-5 на линии клеток мозга человека также увеличивала проницаемость для макромолекул (Luissint et al., 2012). Однако в клеточных линиях различных эпителиев функционирование клаудина-5 достаточно многозначно. В то время как сверхэкспрессия клаудина-5 в клеточной линия кишки Сасо-2 приводила к увеличению трансэпителиального сопротивления и одновременному увеличению межклеточной проницаемости для маннитола, в клеточной линии почки собаки MDCK, напротив, увеличивалось сопротивление и снижалась проницаемость для макромолекул по межклеточному пути (Amasheh et al., 2005). Таким образом, предполагается, что функции клаудина-5 могут зависеть от взаимодействия с другими клаудинами, в частности, было высказано предположение, что для усиления непроницаемости клаудина-5 требуется клаудин-12, который присутствует, например, в эндотелиальных клетках (Coyne et al., 2003).

Еще один представитель данной группы - клаудин -11 - экспрессируется во многих типах эпителиев, однако наиболее широко он представлен в мозге и в клетках Сертоли. У нокаутных мышей дефицит клаудина-11 приводил к нейрональным дефектам и стерильности из-за нарушений в гематотестикулярном барьере (Wessells et al., 2009). Помимо этого мыши, нокаутные по клаудину-11 и клаудину-14, отличались глухотой (Ben-Yosef et al., 2003; Gow et al., 2004). Нарушения в экспрессии клаудина-19 связаны с дефектами зрения, поскольку именно он в настоящее время рассматривается как основной белок плотных контактов в гистогематическом барьере сетчатки (Peng et al., 2011). Кроме того,

нокаут по клаудину-19 у мышей вызывал повреждения в Шванновских клетках, а также нарушение функционирования почек (Miyamoto et al., 2005).

парадигме произошли, когда в результате Основные изменения В исследований было клаудины способны показано, что не все снижать проницаемость плотных контактов, поскольку некоторые клаудины образовывали парацеллюлярные каналы. Эта группа белков в семействе клаудинов относится к увеличивающим проницаемость, или пороформирующим белкам, основной функцией которых является усиление проницаемости эпителиального слоя для ионов, макромолекул и воды. Данная группа включает в себя клаудин-2, -10, -15 и -17 (Rosenthal et al., 2017). Клаудин-2 был первым идентифицированным белком в контактов, который при сверхэкспрессии комплексе плотных уменьшал трансэпителиальное сопротивление в клетках линии MDCK (Furuse et al., 2001). Было обнаружено, что такое изменение основано исключительно на увеличении проницаемости для катионов, и данный факт привел к заключению, что клаудин-2 образует парацеллюлярный катионный канал (Amasheh et al., 2002). Однако недавние исследования продемонстрировали, что клаудин-2 также усиливает проницаемость для воды, и это привело к заключению, что клаудин -2 может межклеточный аналог трансмембранных водных образовывать каналов аквапоринов (Amasheh et al., 2002; Rosenthal et al., 2017). Клаудин-10 имеет два основных варианта сплайсинга, 10a и 10b, которые отличаются по первой трансмембранной области и внеклеточной петле. Клаудин-10b образует катионселективный канал. При этом клаудин-10а может выступать в качестве анионного канала, который обнаружен в проксимальном канальце почки (Van Itallie, Anderson, 2006; Günzel et al., 2009). Клаудин-15 широко экспрессирован в кишечнике (Fujita et al., 2006). Сверхэкспрессия клаудина-15 в линии клеток почки свиньи увеличивает проницаемость для катионов (Van Itallie et al., 2003). При этом, у мышей с дефицитом клаудина-15 развивается так называемый мегаколон, который характеризуются двукратным увеличением длины и диаметра сегментов тощей и толстой кишки (Tamura et al., 2008). Важно отметить, что у взрослых мышей клаудин-15 экспрессируется в кишечных ворсинках, где преобладает симпортер натрия и глюкозы SGLT1 (Tamura et al., 2011). Таким образом, предполагают, что клаудин-15 и SGLT1 могут взаимодействовать, обеспечивая рециркуляцию натрия в кишечнике.

Недавно было показано, что клаудин-17 образует плотные контакты с ярко выраженной селективностью для анионов (Krug et al., 2012). Экспрессия клаудина-17 была обнаружена, главным образом, в двух органах: в мозге и проксимальных канальцах почек. Проксимальный каналец характеризуется высокой реабсорбцией хлора, что позволяет предположить, что клаудин-17 обладает уникальной физиологической функцией в данном процессе.

Третья группа белков в семействе клаудинов в настоящее время обозначается как белки с неопределенной функцией. По данным литературы, некоторые клаудины не обладают явной уплотняющей или каналообразующей активностью, и их функция может зависеть от наличия других белков плотных контактов. С одной стороны, это может быть связано с прямым взаимодействием этих белков со специфическими партнерами. С другой стороны, это может быть связано с изменением уровня белков плотных контактов с более выраженной функцией уплотнения или порообразования. Таким образом, белки плотных контактов с неопределенной функцией могут быть описаны как снижающие проницаемость в одной системе, и как пороформирующие в другой (Shen et al., 2011). Данная группа белков включает клаудин-4, -7, -8 и -16. Сверхэкспрессия клаудина-4 в линии клеток почки собаки приводила к увеличению трансэпителиального сопротивления, а также к снижению проницаемости для ионов натрия, обозначая роль клаудина-4 как уплотняющего белка (Van Itallie et al., 2001). В то же время нокдаун клаудина-4 в линии клеток почки мыши также приводил к увеличению трансэпителиального сопротивления и снижению проницаемости для ионов хлора, что указывало на его роль в качестве канала для анионов (Hou et al., 2010). Одной из причин получения таких результатов в различных клеточных моделях может быть различный статус фосфорилирования клаудина-4. Фосфорилирование клаудина-4 может быть кофактором, поскольку было показано, что проницаемость анионов коррелирует с фосфорилированием клаудина-4 в клетках линии собирательной трубки крысы (Le Moellic et al., 2005). Подобно клаудину-4 сверхэкспрессия или нокдауны клаудина-7 также приводили к неодинаковым результатам в разных клеточных линиях. Нокдаун клаудина-7 в линии клеток почки собаки снижал транспителиальное сопротивление, увеличивая проницаемость для ионов натрия (Hou et al., 2006). В то же время, только его сверхэкспрессия в клетках линии почки свиньи способствовала усилению

барьерных свойств из-за снижения проницаемости для ионов хлора и паралелльного (Alexandre увеличения проницаемости для ИОНОВ натрия et al., 2005). Сверхэкспрессия клаудина-8 также приводила к снижению проницаемости для одновалентных и двухвалентных катионов, включая протоны и ионы аммония, а также к бикарбонату в клеточной линии почки собаки (Yu et al., 2003; Angelow et al., 2006). Было показано, что клаудин-8 локализуется в плотных контактах сегментов почки, чувствительных к альдостерону, а именно в дистальном канальце и собирательной трубочке (Li et al., 2004), а также в толстой кишке (Zeissig et al., 2007). Было клаудин-8 увеличивает селективный показано. что ДЛЯ катионов эпителиальный барьер (Amasheh et al., 2002; Jeansonne et al., 2003). Этот эффект может быть достигнут либо прямыми уплотняющими свойствами клаудина-8 (Jeansonne et al., 2003), либо за счет замещения порообразующих клаудинов, таких как клаудин-2 (Yu et al., 2003). Поскольку клаудин-2 не был обнаружен в дистальной части толстой кишки человека, данное предположение может быть исключено изначально (Amasheh et al., 2009). Роль клаудина-16 в настоящее время также неясна. Первоначально считалось, что клаудин-16 образует поры для магния, поскольку его мутации вызывали гипомагниемию и нефрокальциноз (Simon et al., 1999). Клаудин-16 локализуется преимущественно в восходящей петле Генле, где происходят процессы реабсорбции магния. Однако данное предположение невозможно было подтвердить экспериментально. Альтернативное объяснение роли клаудина-16 состояло в том, что зависимые от него изменения проницаемости для ионов натрия могли влиять на транспорт магния (Günzel et al., 2009; Kausalya et al., 2006). Недавние исследования установили, что клаудин-16 встраивается в комплекс плотных контактов в ответ на изменение уровня клаудина-19 (Hou et al., 2009).

Другие представители семейства белка клаудина в настоящее время не отнесены к какой-либо из этих трех групп, поскольку в настоящее время для них не выявлена конкретная роль в изменении межклеточной проницаемости, несмотря на уже выявленные экспериментально данные об их структуре и аминокислотной последовательности.

Исследуя барьерные свойства тканей важно понимать, что в клетках одновременно экспрессируются разные клаудины в различных комбинациях и пропорциях, функциональное взаимодействие которых обусловливает различия как

в барьерной, так и в пропускной способности плотных контактов в зависимости от типа эпителия (Markov et al., 2015). При этом даже в разных участках одной системы органов уровень белков данного комплекса может варьировать, что было показано, например, для эпителия почки и кишечника (Amasheh et al., 2011b; Günzel, Yu, 2013). Например, в исследовании экспрессии клаудинов в эпителии кишки крысы было показано, что паттерн распределения белков плотных контактов совпадает с проницаемостью различных сегментов кишки. Так, в более проницаемом эпителии тощей кишки преобладал порообразующий клаудин-2, при этом уровень уплотняющих клаудинов-5 и -8 был существенно ниже. В отличие от тощей кишки, в более плотном эпителии толстой кишки был определен увеличенный пул экспрессии уплотняющих клаудинов-1, -3, -5 и -8 (Markov et al., 2010). По результатам данных исследований было предположено, что паттери экспрессии клаудинов в ткани варьирует согласно функции и барьерным свойствам участка. Эта данные демонстрируют также, что комплекс белков плотных контактов является динамической структурой, в которой уровень и локализация разных представителей семейства белка клаудина может изменяться под влиянием различных факторов.

Изучение процесса парацеллюлярного транспорта через плотные контакты в настоящее время широко исследуется, поскольку точная регуляция именно данного транспортного пути играет решающую роль для нормального функционирования эпителиальных клеток. К факторам, которые играют роль в обеспечении той или иной проницаемости плотных контактов, относятся ионы и их транспортеры. Однако на данный момент в литературе практически нет данных о функциональном взаимодействии комплекса плотных контактов и переносчиков в плазматической мембране клеток.

1.3 Синергизм движения ионов и барьерные свойства

В настоящее время известно о некоторых каналах и переносчиках ионов, которые, вероятно, участвуют в регуляции проницаемости плотных контактов (Rajasekaran et al., 2008). Понимание молекулярной основы поглощения питательных веществ важно для понимания определенных биологических систем и их заболеваний, включая недоедание, ожирение и диабет. Хотя эндоцитоз участвует во всасывании питательных веществ, в настоящее время существует общее мнение, что критическую роль играют транспортеры, специфичные для каждого вида нутриентов. При этом абсорбция питательных веществ и воды в эпителии кишечника критически зависит от целостности барьера (Pácha, 2000).

Важной характеристикой многих основных переносчиков, связанных с нутриентами, является то, что они функционируют посредством симпорта с натрием; к ним относятся переносчики глюкозы, такие как SGLT-1 (Kellett, Brot-Laroche, 2005), переносчики аминокислот (Bröer, 2008), и апикальный натрийзависимый переносчик желчных кислот (ASBT) (Nassir et al., 2007). Для регулирования этих транспортеров, концентрация натрия в просвете кишечника, который поступает с пищей и взаимодействует с апикальными мембранами эпителиальных клеток, считается критически важной (Schultz, Curran, 1970). Однако стандартная пища и секреция натрия из различных отделов желудочно-кишечного тракта и из печени, как часть процесса пищеварения, не обеспечивают достаточное количество натрия для процессов абсорбции пищи. Было высказано предположение, что натрий поступает в просвет по парацеллюлярному пути в направлении от подслизистой оболочки к просвету, и является критическим для абсорбции (Kapus, Szászi, 2006). Установлено, что некоторые клаудины, такие как клаудин-2 и -15, участвуют в организации селективного парацеллюлярного пути для ионов и воды (Colegio et al., 2002; Van Itallie, Anderson, 2006). Эксперименты с мышами, нокаутными по данным белкам, показали, что мыши погибают на 25-ый день из-за мальабсорбции трех основных нутриентов, транспорт которых связан с натрием. В данном исследовании установили, что клаудин-2 и -15, порообразущие белки плотных контактов, поддерживают концентрацию натрия в просвете тонкой кишки, реализуя избирательную межклеточную проницаемость для натрия, активируя симпорт натрия и нутриентов в апикальной мембране. Было предположено, что в тощей кишке человека in vivo обратная утечка натрия (т.е. от подслизистой оболочки просвету) была вызвана отрицательным зарядом в просвете, который К индуцировался активным поглощением глюкозы. В данном исследовании в тонкой кишке ввиду двойного нокаута клаудина-2 и -15 обратная утечка натрия отсутствовала (Tamura et al., 2011).

В то время как значительная часть абсорбции происходит путем активного транспорта в эпителиальных клетках, было высказано предположение, что

транспорт глюкозы по межклеточному пути также вносит вклад в изменение трансцеллюлярной абсорбции нутриентов (Pappenheimer, 1993; Turner, 2000).

SGLT-1, локализованный с апикальной стороны в кишечных энтероцитах, является ко-транспортером ионов натрия и глюкозы (Wright, Turk, 2004). Глюкоза и натрий входят в клетки совместно трансцеллюлярно через апикальный SGLT, используя потенциальную энергию электрохимического градиента натрия. В дальнейшем глюкоза выходит из клетки через базолатеральную мембрану с помощью транспортера глюкозы GLUT2 или экзоцитозом, а натрий откачивается из клетки через Na,K-ATФазу. Однако было показано, что абсорбция глюкозы через SGLT-1 трансэпителиального вызывает паление сопротвления (Madara, Pappenheimer, 1987) и увеличивает проницаемость для макромолекул по межклеточному пути. Регуляция парацеллюлярной проницаемости, зависимая от котранспорта натрия и глюкозы, также была описана у крыс и в культуре клеток кишки Caco-2 (Turner et al., 1997). В клетках тонкого кишечника с усиленной абсорбцией трансэпителиального глюкозы снижение сопротивления сопровождалось локальным нарушением плотных контактов и конденсацией микрофиламентов в актомиозиновом кольце (Madara, Pappenheimer, 1987). Кроме иммуноэлектронной микроскопии того, с помощью была выявлена пространственная диссоциация между адаптерным белком плотных контактов ZO-1 и клаудинами (Atisook, Madara, 1991). Изменения парацеллюлярной проницаемости и морфологии плотных контактов в присутствии активного симпорта натрия и глюкозы были связаны с повышенным фосфорилированием регуляторной легкой цепи миозина II (Turner et al., 1997; Berglund et al., 2001).

Помимо того, что трансцеллюлярный транспорт глюкозы через SGLT-1 приводит к абсорбции натрия и глюкозы, этот процесс также сопровождается поглощением ионов хлора, бикарбоната и воды в эпителиальную клетку. В результате алкалоза и набухания клеток при активации данного симпорта, в качестве регуляторного ответа активируется апикальный обменник натрия и протонов (NHE3). Ингибирование обменника амилоридом в монослоях клеток кишки Caco-2 приводило к увеличению трансэпитеиального спортивления и снижению фосфорилирования MLC (Turner et al., 2000). Однако в этих исследованиях NHE3 не влиял на изменения сопротивления в отсутствие активного SGLT-1, что позволяет

предположить, что NHE3-опосредованные пути обмена и транспорт натрия и глюкозы совместно участвуют в регуляции парацеллюлярной проницаемости.

В целом, такие органы как кишечник и почечные канальцы, следуют особой стратегии абсорбции растворенных веществ и воды. По сравнению с проксимальными частями дистальные сегменты характеризуются регулируемым транспортом и гораздо более выраженными барьерными свойствами, а также низкими скоростями поглощения, которые могут иметь место при больших электрохимических градиентах.

Одним из наиболее известных переносчиков, которые регулируют функцию плотных контактов, является Na,K-ATФаза, член семейства ATФаз Р-типа, транспортирующих катионы.

1.4 Векторность транспорта в эпителии.

Na,K-ATФаза, также известная как натриевая помпа, обнаруживается в клетках всех высших эукариот и переносит натрий из клетки и калий в клетку путем гидролиза одной молекулы АТФ (Clausen, Poulsen, 2013). В дополнение к поддержанию внутриклеточного ионного гомеостаза этот процесс накачки генерирует трансмембранный электрохимический градиент, который регулирует другие клеточные активности, такие как вторичный активный транспорт других ионов, питательных веществ и нейротрансмиттеров, поддержание внутриклеточного pH, объема и размера клеток, а также для электрической возбудимости (Xie, Askari, 2002). В большинстве эпителиальных клеток Na,K-АТФаза локализуется с базолатеральной стороны, однако для сетчатки глаза характерна локализация помпы с апикальной стороны, что связано с особенностью ее функционирования (Rizzolo, участвуют в регуляции Градиенты, генерируемые Na,К-АТФазой, 2014). направленного транспорта молекул через эпителиальные клетки (Matchkov, Krivoi, 2016; Cui, Xie, 2017). Последние данные свидетельствуют о том, что Na,K-ATФаза может играть роль в транспорте через эпителиальный барьер, регулируя структуру и проницаемость плотных контактов (Rajasekaran, Rajasekaran, 2009).

Функционально Na,K-АТФаза представляет собой интегральный гетеродимерный белок, состоящий из α-субъединицы и β-субъединицы (Shull et al., 1986). Также была описана третья, специфическая для ткани, регуляторная γсубъединица, член семейства FXYD (Geering, 2006). α-субъединица является

каталитической субъединицей Na,K-АТФазы, и в клетках млекопитающих были идентифицированы четыре различные изоформы (Blanco, Mercer, 1998). Каждая изоформа обладает уникальными кинетическими свойствами и отличительной реакцией на вторичные мессенджеры (Blanco, 2005). Необходимо отметить тканеспецифичную экспрессию разных изоформ α-субъединицы: для эпителия кишечника, почки, эритроцитов и легких характерна α1-изоформа, которая является основной изоформой для всех типов тканей. При этом для других типов клеток характерна комбинация α1 и других изоформ. В клетках скелетных мышц, кардиомиоцитах и гладкомышечных клетках коэкспрессированы α1 и α2 изоформы, для нервной ткани характерна комбинация α1 и α3 изоформ Na,K-ATФазы (Dobretsov, Stimers, 2005; Matchkov, Krivoi, 2016; Clausen et al., 2017). α-субъединица имеет молекулярную массу около 110 кДа, 10 трансмембранных сегментв и с 5 внеклеточными петлями, оба конца расположены внутриклеточно. Она содержит сайты связывания для Na⁺, K⁺, АТФ и кардиотонических стероидов, таких как специфический ингибитор Na,К-АТФазы уабаин или маринобуфагенин (Khalaf et al., 2018). Ранее опубликованная кристаллическая структура Na-K-ATФазы показала, α-субъединицы карбокси-конец содержится что В кармане между трансмембранными спиралями как регуляторный элемент, контролирующий связывание с натрием (Morth et al., 2007).

β-субъединица Na,K-ATФазы представляет собой мембранный белок, содержащий около 370 аминокислот; было идентифицировано три изоформы у млекопитающих (Blanco, 2005). Молекулярная масса β -субъединицы составляет около 40-60 кДа и варьируется в зависимости от типа ткани и изоформы. Точная роль β -субъединицы до сих пор не известна, и последние данные свидетельствуют о том, что она может иметь функции, которые не вносят вклад в активность Na,K-ATФазы. Было показано, что β-субъединица необходима для складывания α-субъединицы в эндоплазматической сети и для ее доставки к плазматической мембране (Geering, 2001), а также для удержания Na,K-ATФазы в мембране клетки, которое зависит от гликозилирования β-субъединицы (Shoshani et al., 2005; Vagin et al., 2006). Было высказано предположение, что β-субъединица может быть также вовлечена в регулирование транспортной функции α-субъединицы (Lutsenko, Kaplan, 1993; Geering, 2001). Субъединицы Na,K-ATФазы взаимодействуют со множеством белков, включая транспортеры ионов, структурные и сигнальные белки (Rajasekaran et al., 2008). Было показано, что α-субъединица взаимодействует с белками цитоскелета, такими как актин-связывающий белок анкирин (Nelson, Veshnock, 1987; Devarajan et al., 1994) и кофилин (Lee et al., 2001). α-субъединица также взаимодействует с белками, связанными с механизмами эндоцитоза, такими как белок-адаптер клатрин (Ogimoto et al., 2000) и кавеолин (Wang et al., 2004). Последние данные указывают на то, что Na,K-ATФаза связывается с белками, участвующими в передаче сигналов в клетках, формируя единый функциональный скаффолд. α-субъединица связывает несколько сигнальных молекул, таких как фосфоинозитол-3-киназа (Barwe et al., 2005), Src-киназа (Tian et al., 2006), фосфолипаза C-1 и рецептор инозитол-1,4,5трифосфата (Yuan et al., 2005).

Роль Na,K-АТФазы как модулятора сигналинга в клетках становится общепризнанной. Ингибирование функции Na,K-АТФазы уабаином или низкой концентрацией калия увеличивает экспрессию протоонкогенов c-fos и c-jun (Nakagawa et al., 1992). Более поздние исследования показали, что ингибирование Na,К-АТФазы уабаином приводит к активации активируемой митогеном протеинкиназы (MAPK) (Kometiani et al., 1998). Кроме того, было установлено, что Na,K-АТФаза связывает Src-киназу, ингибируя ее функцию. При этом добавление уабаина освобождает домен киназы и приводит к ее активации (Tian et al., 2006; Venugopal, Blanco, 2017; Rajamanickam et al., 2017b). Возможно, этот механизм участвует в трансактивации рецептора к эпидермальному фактору роста и активации каскада киназ (Haas et al., 2002; Pierre, Xie, 2006), которые приводят к изменению уровня белков плотных контактов и барьерных свойств эпителия (Larre et al., 2010; Rincon-Heredia et al., 2014; Dietze et al., 2015b). Ингибирование обменника NHE3 (Oweis et al., 2006) уабаином связано с регулированием транспорта NHE3, который зависит от индуцированной уабаином передачи сигналов Na,K-ATФазы (Cai et al., 2008). Хотя некоторые сигнальные функции, по-видимому, связаны с изменениями ионного гомеостаза ввиду ингибирования Na,K-АТФазы, другие не зависят от функции насоса и скорее связаны со взаимодействием субъединиц Na,K-ATФазы с сигнальными молекулами (например, передача сигналов Src-киназы и MAPK).
1.5 Взаимодействие клаудинов и Na,K-АТФазы

Было показано, что субъединицы Na,K-АТФазы могут играть роль в организации и проницаемости плотных контактов. Экспрессия α1-субъединицы Na,К-АТФазы в трансформированных вирусом саркомы Молони (MSV) клетках образование функциональный MDCK индуцирует плотных контактах И эпителиальную полярность этой клеточной линии (Rajasekaran et al., 2001). Кроме того, в данной культуре клеток обнаружена низкая экспрессия E-кадгерина (Behrens et al., 1989). Было сделано предположение, что α1-субъединица Na,K-ATФазы функционально взаимодействует с Е-кадгерином и, таким образом, индуцирует сборку и функционирование плотных контактов. В последующих исследованиях с использованием специфического ингибитора Na,K-АТФазы уабаина и снижения концентрации калия в качестве двух независимых методов блокады активности помпы было показано, что активность Na,K-ATФазы участвует в регуляции плотных контактов (Rajasekaran et al., 2001, 2003, 2007). Используя линию клеток почки собаки MDCK также было показано, что ингибирование активности Na,K-ATФазы дезорганизует и предотвращает образование плотных контактов (Larre et al., 2010). Кроме того, использование уабаина в микромолярных концентрациях, также блокирующих Na, K-АТФазы, активность приводила К снижению трансэпителиального сопротивления в линии клеток кишки Caco-2 (Basuroy et al., 2003).

Ранее была предположена двухэтапная модель сборки плотных контактов в эпителиальных клетках. Согласно этой модели, первый шаг включает в себя опосредованные Е-кадгерином сигнальные процессы, которые транслоцируют белки плотных контактов в плазматическую мембрану, где они собираются и образуют комплекс нитей. Второй этап регулируется Na,K-ATФазой, которая включает полимеризацию актина (Rajasekaran et al., 2003). Хотя эта модель предполагает, что Е-кадгерин и Na,K-ATФаза являются двумя основными участниками образования плотных контактов, а также формирования поляризации эпителия, в настоящее время предполагают, что другие сигнальные механизмы, модулированные этими или другими белками, участвуют в процессе эпителиальной поляризации.

Регуляторные и сигнальные функции Na,K-АТФазы также могут вносить вклад в поддержание функции и структуры плотных контактов. В поляризованное культуре клеток пигментного эпителия сетчатки человека и в поляризованной клеточной линии поджелудочной железы человека ингибирование активности Na,K-АТФазы приводило к дезорганизации плотных контактов и увеличивало проницаемость как для ионов, так и для макромолекул (Rajasekaran et al., 2003, 2007). В клетках поджелудочной железы α-субъединица Na,К-АТФазы была связана с PP2A, гетеротримерной протеинфосфатазой, которая является убиквитарной и консервативной серин/треонин фосфатазой, локализованной в плотных контактов. Ингибирование активности Na,K-ATФазы значительно снижало активность PP2A, что также коррелировало с увеличением фосфорилирования окклюдина и проницаемости плотных контактов. Мечение иммунным золотом и электронная микроскопия подтвердили, что α-субъединица помпы локализуется в области плотных и адгезионных (Rajasekaran et al., 2007). Анализ коиммунопреципитации в клетках поджелудочной железы человека показал, что, вероятно, окклюдин колокализован с α-субъединицей Na,K-ATФазы (Rajasekaran, Rajasekaran, 2009). Эти исследования показали, что Na,K-ATФаза может быть локализована в плотных контактах и вносит вклад в регуляцию их структуры и проницаемости. Независимо от того, регулирует ли Na,K-АТФаза функцию ионного баланса в области плотных контактов или модулирует передачу сигналов посредством своего взаимодействия с другими сигнальными молекулами или самими белками плотных контактов, эта проблема остается мало изученной.

Экспериментальные данные свидетельствуют о том, что Na,K-ATФаза может действовать как сигнальный каркас, который может быть связан либо с комплексом плотных контактов, либо быть локализован рядом с ними. Обработка различных клеточных линий ингибитором помпы уабаином включает активацию нескольких сигнальных путей; некоторые из которых, по-видимому, активируются независимо от насосной функции Na,K-ATФазы (Xie, Cai, 2003; Barwe et al., 2005; Pierre, Xie, 2006). Интересно, что некоторые из сигнальных событий, опосредованных Na,K-ATФазой, перекрываются с сигнальными путями, которые, как было показано, могут регулировать плотные контакты (Takaishi et al., 1997; Jou et al., 1998; Dostanic et al., 2004). Na,K-ATФаза также может образовывать сигнальный комплекс с с-Src-

киназой при действии уабаина (Tian et al., 2006). Было показано, что гетеротримерный G-белок G-12 в клетках линии почки собаки MDCK вносит вклад в регуляцию плотных контактов, по крайней мере частично, через сигнальный путь с-Src-киназы (Meyer et al., 2003; Sabath et al., 2008), а в клетках Caco-2 разрушение плотных контактов, вызванное окислительным стрессом, также опосредуется активацией с-Src (Basuroy et al., 2003). Аналогично, активация пути MAP-киназного каскада вызывает дезорганизацию в эпителиальных клетках роговицы человека (Wang et al., 2004). В отличие от этих исследований, предполагают, что МАРК опосредует EGF-индуцированное разрушение плотных контактов посредством их взаимодействия с окклюдином (Basuroy et al., 2006). В работе, проведенной на линии Сертоли крыс, было показано увеличение трансэпителильального клеток сопротивления и клаудина-1 и -11 при действии наномолярных концентраций уабаина в течение 3-х дней. Предполагаемый механизм изменения молекулярного состава плотных контактов при изменении активности Na,K-ATФазы связывают с активацией c-Src-EGFR-Erk1/2 сигнального пути (Rajamanickam et al., 2017).

В подавляющем большинстве работ для изменения активности Na,K-ATФазы используют ее специфический блокатор уабаин, сайтом связывания для которого является α-субъединица Na,K-ATФазы. Однако было установлено, что низкие, наномолярные концентрации уабаина могут усиливать барьерные свойства эпителия и снижать проницаемость плотных контактов (Larre et al., 2010).

1.6 Эндогенный уабаин как гормон

В 1991 году было установлено, что уабаин является гормоном, уровень в крови которого увеличивается при различных состояниях, таких как хроническая почечная недостаточность (Stella et al., 2008), хроническое потребление соли (Blanco, Wallace, 2013), застойная сердечная недостаточность (Manunta et al., 2009, 2010), гипертония (Hauck, Frishman, 2012), беременность (Dvela-Levitt et al., 2015) и первичный гиперальдостеронизм (Rossi et al., 1995). Этот стероид также связан со стрессовыми состояниями, такими как интенсивные физические упражнения (Bauer et al., 2005). Кроме того, высокие уровни уабаина коррелируют с концентрацией кортизола (Berendes et al., 2003), что усиливает его роль как гормона стресса. Эндогенный уабаин синтезируется в клубочковой и пучковой зоне коры надпочечников (Masugi et al., 1988; Laredo et al., 1995) с использованием

гидроксихолестерола, прегненолона и прогестерона в качестве предшественников (Hamlyn et al., 1998; Schoner, Scheiner-Bobis, 2007). Однако конкретные механизмы его синтеза на данный момент неизвестны. Уабаин высвобождается в кровоток после его стимуляции адренокортикотропным гормоном (Lewis et al., 2014), адреналином (Schoner, Scheiner-Bobis, 2005), ангиотензином II (Laredo et al., 1997) и агонистами (Schoner, Scheiner-Bobis, 2007). α1-адренорецепторов Эндогенный уабаин циркулирует в крови в субнаномолярном диапазоне концентраций (Khalaf et al., 2018). Предполагается, что эндогенный уабаин участвует во множестве клеточных процессов, включая экспрессию генов, клеточное деление и рост, нейропротекцию, дифференциацию клеток, воспаление, водно-солевой обмен, и регуляцию кровяного давления (Лопатина et al., 2008; Bagrov et al., 2009; Hamlyn, Manunta, 2015; Lopatina et al., 2016; Blaustein, 2018; Lichtstein et al., 2018).

Данные о действии уабаина на барьерные свойства эпителиальных тканей и проницаемость плотных контактов немногочисленны и получены только на клеточных линиях. По литературным данным установлено, что 1.0 М уабаин дезорганизует различные межклеточные контакты путем отсоединения от плазматической мембраны молекул, от которых зависит прикрепление к субстрату, а также сцепление клеток между собой (Contreras et al., 1999). Впоследствии было установлено, что использование концентраций уабаина от 10 до 50 мкМ предотвращало образование плотных контактов, снижало трансэпителиальное сопротивление и увеличивало парацеллюлярную проницаемость для маннитола и инулина (Larre et al., 2010). Этот эффект также наблюдался в других эпителиальных типах клеток, таких как пигментные эпителиальные клетки сетчатки человека (Rajasekaran et al., 2003). Также было показано, что уабаин увеличивает проницаемость плотных контактов посредством активации cSrc- EGFR- ERK1/2 зависимого сигнального пути, который вызывает интернализацию и деградацию белков плотных контактов. В то время как полная деградация окклюдина и ZO-1 и частичная деградация клаудина-4 зависят от пути ERK1/2, механизм деградации клаудина-2 происходил иным сигнальным путем (Rincon-Heredia et al., 2014).

На клеточной линии почки собаки MDCK было показано, что низкие концентрации уабаина (10-50 нМ) значительно увеличивают трансэпителиальное сопротивление, которое сопровождается изменением в составе белков плотных контактов (Larre et al., 2010). При этом использование уабаина в концентрации 1000 нМ полностью разрушает плотные контакты спустя сутки после начала эксперимента. В работах на клетках Сертоли были продемонстрированы аналогичные эффекты, связанные с усилением барьерных свойств и изменением молекулярного состава плотных контактов при действии уабаина в наномолярном диапазоне концентраций(Dietze et al., 2015a; Rajamanickam et al., 2017a).

Несмотря на то, что в настоящее время имеются данные о влиянии эндогенного уабаина на сердечно-сосудистую, нервную систему, а также на почки, эффект уабаина в наномолярных концентрациях на регуляцию барьерных свойств и изменение молекулярного состава плотных контактов в эпителии кишки остается невыясненным.

1.7 Нарушение кишечного барьера

Несмотря на сильную многокомпонентную структуру слизистого барьера кишечника и различные механизмы, обеспечивающие защиту от патогенных микроорганизмов, последние могут проникать К эпителиальным слоям. Взаимодействие эпителия и клеток врожденного иммунитета с патогенными трансмембранных структурами опосредуется наличием или цитозольных рецепторов, которые носят название патоген-распознающие рецепторы (PRR pattern recognition receptors). Эти рецепторы способны к распознаванию специфических микробных соединений – патоген-ассоциированных молекулярных паттернов (PAMPs -pathogen-associated molecular patterns). PRR включают в себя несколько семейств, среди которых можно выделить: Toll-подобные рецепторы (TLRs – toll-like receptors), NOD-подобные рецепторы (NLRs – nucleotide oligomerization domain-like receptors) и RIG-подобные рецепторы (RLRs - retinoic acid inducible gene I-like receptors). PRRs активируют нижестоящие сигнальные пути посредством узнавания специфических лигандов - PAMPs. Активация нижестоящих сигнальных путей запускает ряд физиологических эффектов: рекрутирование и высвобождение цитокинов, хемокинов, гормонов и факторов роста; индуцирование хронического воспаления; формирование воспалительного микроокружения; инициирование врожденного иммунного и последующего адаптивного иммунного ответа, удаление мертвых или мутировавших клеток (Li, Wu, 2021).

Toll-подобные рецепторы (TLR) являются одними из самых ранних PRR, обнаруженных в системе врожденного иммунитета, которые играют важную роль в воспалительных реакциях (Iwasaki, Medzhitov, 2010). Впервые ген TLR были обнаружены у дрозофилы в 1994г. Исследования показали, что функция этого гена связана с формированием дорсально-вентральной оси во время эмбрионального развития дрозофилы (Schneider et al., 1994). В 1988 г. Хасимото и др. обнаружили, что ген Toll кодирует трансмембранный белок и в дальнейшем изучили его структуру (Hashimoto et al., 1988). В 1996 году команда Хоффмана обнаружила, что белок Toll играет роль в устойчивости дрозофилы к грибковой инфекции. Tollактивированные мутанты устойчиво экспрессируют противогрибковые пептиды, тогда как Toll-делеционные мутанты, наоборот, теряют способность купировать грибковую инфекцию (Lemaitre et al., 1996). В 1997 г. Дженевей и соавт. клонировали TLR4 человека. Они показали, что TLR4 может индуцировать транскрипционного ядерного фактора NF-κB экспрессию активацию И костимулирующей молекулы CD80. Это доказывает, что, благодаря этим врожденного иммунитета распознает рецепторам, система патогенные микроорганизмы и активирует экспрессию второго сигнала, необходимого для активации адаптивного иммунитета (Medzhitov et al., 1997). В дальнейшем были обнаружены и другие семейства PRRs, при этом исследователи показали, что NLRs защищают внутриклеточный цитозольный компартмент И отвечают 38 формирование особой молекулы в иммунной защите - инфламмасомы, RLRs направлены на защиту цитозольного компонента от вирусов, в то время как TLRs распознает элементы межклеточного и эндосомального пространства (Elia et al., 2015). На сегодняшний день известно 10 функциональных TLR (TLR1-10) у человека и 12 (TLR1-9 и TLR11-13) у мышей (Lauw et al., 2005; Temperley et al., 2008; Andrade et al., 2013). Некоторые TLR (TLR1, 2, 4, 5, 6, 10) экспрессируются на поверхности иммунных клеток в виде гетеродимеров или гомодимеров, в основном узнающих мембранные компоненты патогенных микроорганизмов, такие как липиды, липопротеины и белки; другие (TLR3, 7, 8, 9) экспрессируются в виде гомодимеров, которые в основном узнают нуклеиновые кислоты микроорганизмов (Chuenchor et al., 2014). Активация TLR необходима для увеличения пролиферации после повреждения кишечника. Кроме того, передача сигналов Toll-подобного рецептора 2 (TLR2) способствует усилению плотных контактов в кишечном эпителии. Интересно отметить, что некоторые TLR принципиально по-разному распознают лиганды (Vidya et al., 2018). Так, TLR4 специфически распознает липополисахариды (ЛПС).

ЛПС является компонентом внешней клеточной стенки грамотрицательных бактерий и наиболее известным бактериальным эндотоксином (Page et al., 2022). ЛПС состоит из трех частей: липида А (жирная кислота и гидрофобный хвост); ядро разделено на внутреннее и внешнее ядро (олигосахарид, содержащий остатки сахара) и боковую цепь О (повторяющиеся остатки сахара) (Bertani, Ruiz, 2018). TLR4 распознает бактериальные ЛПС, связывание которых приводит к клеточной активации, вызывая высвобождение провоспалительных цитокинов. Эта стратегия распознавания является первой линией защиты от бактериальных инфекций, а ЛПС является самым мощным иммуностимулятором, известным на сегодняшний день. На клеточной поверхности первым белком, участвующим в распознавании ЛПС, является ЛПС-связывающий белок (LBP) (Mohammad, Thiemermann, 2021). LBP присутствует в виде растворимого белка или белка плазматической мембраны в кровотоке; он распознает и образует комплекс с липидной частью ЛПС в плазме -ЛПС-LВР. Мембранный рецептор CD14 находится на поверхности клеток иммунной системы и эпителиальных клеток. LBP позволяет ЛПС взаимодействовать с mCD14 на клеточной поверхности; он переносит ЛПС-LBP на белок миелоидной дифференцировки-2 (MD-2) (Park, Lee, 2013). MD-2 – это белок-корецептор TLR4, который нековалентно связывается с TLR4 и действует как сайт связывания ЛПС. Как только ЛПС связывается с комплексом TLR-CD14-MD-2 и распознается, TLR4 активируется и подвергается олигомеризации, что позволяет рекрутировать нижестоящие адаптеры. Ответ, опосредованный ЛПС/TLR4, запускает два различных сигнальных пути: MyD88-зависимый путь, который имеет тенденцию возникать раньше и запускается всеми типами TLR, кроме TLR3. Он включает рекрутирование TIRAP на клеточной мембране, за которым следует рекрутирование MyD88. Второй путь - MyD88-независимый путь, который происходит во время поздней фазы ответа (Núñez Miguel et al., 2007; Lu et al., 2008).

МуD88 принадлежит к семейству адапторных молекул, содержащих цитозольный TIR-домен (Yamamoto, Takeda, 2010). При стимуляции лигандом

МуD88-зависимый путь приводит к высвобождению NF-кВ (p50/p65), в свою очередь, обеспечивает его транслокацию в ядро, инициируя транскрипцию генов провоспалительных цитокинов, включая TNF- α , IL-18, IL-6, IL-1 α и IL-1 β (Kawasaki, Kawai, 2014; Oh et al., 2019).

Таким образом, ЛПС является мощным активатором воспалительной реакции, поэтому даже небольшие количества ЛПС, присутствующие в крови из-за бактериальной инфекции, достаточны, чтобы вызвать воспалительную реакцию взаимолействие с Toll-подобными рецепторами (Rhee. 2014). через Провоспалительные цитокины, такие как TNF-а и II-6, вызывают увеличение проницаемости плотных контактов, поскольку TNF-α активирует путь NF-kB и снижает уровень белка ZO-1, и подавляет барьерную функцию плотных контактов (Ma et al., 2004). Увеличение проницаемости плотных контактов эпителия кишки позволяет ЛПС проникать в кровоток, что приводит к воспалению. Поскольку ЛПС взаимодействовать с иммунными клетками и может адипоцитами, такое проникновение приводит к потенциально хроническому системному воспалению. Важно отметить, что ингибирование активации NF-кВ фармакологическими ингибиторами приводит к снижению проницаемости плотных контактов (Ye et al., 2006).

Грамотрицательные бактерии с устойчивостью к антибиотикам становятся все более серьезной проблемой. Следовательно, актуальной задачей является поиск различных регуляторных молекул, которые могли бы предотвращать и восстанавливать кишечный барьер. Одним из подходов является применение эндогенных веществ, которые могут синтезироваться в организме и потенциально устранять нарушения эпителиального барьера кишки, которые были вызваны ЛПС.

Гормон уабаин способен модулировать многие аспекты иммунной системы и считается в целом иммуномодулирующей молекулой (Rodrigues-Mascarenhas et al., 2009). Уабаин in vitro ингибирует митоген-индуцированную пролиферацию тимоцитов и лимфоцитов (Szamel et al., 1981; Pires et al., 1997), ингибирует генерацию активности лимфокин-активируемых киллеров (LAK) (de Moraes et al., 1989), и в целом действует синергически с кортикостероидами на клетки тимуса как in vitro, так и in vivo (Mann et al., 2001; Rodrigues-Mascarenhas et al., 2006). Кроме того, уабаин подавляет экспрессию mCD14 на моноцитах, что, вероятно, может быть

связано со снижением воспалительной реакции ЛПС (Valente et al., 2009). Было показано, что уабаин регулирует процесс воспаления путем ингибирования сигнального пути TNF-a/NF-кВ в клетках HeLa и клетках 293T (Yang et al., 2005). В время исследователи продемонстрировали противовоспалительное и то же обезболивающее действие уабаина путем ингибирования активации NF-кB, которая была инициирована путем введения различных воспалительных агентов (de Vasconcelos et al., 2011). На клеточной линии моноцитов крови человека и в мышах уабаин в высоких дозах подавлял исследовании на продукцию провоспалительных цитокинов IL-6 и TNF- α, которые были вызваны ЛПС (Matsumori et al., 1997). Также было продемонстрировано, что уабаин может негативно модулировать воспаление дыхательных путей при индуцированном липополисахаридом остром поражении легких у мышей (Wang et al., 2018). Однако в настоящее время нет данных о влиянии циркулирующего уабаина на повреждение кишечника, вызванное введением ЛПС.

Таким образом, на данный момент имеются лишь отдельные данные о регуляции низкими концентрациями уабаина проницаемости эпителиев, однако это исследования, проводимые только на клеточных культурах. Данных о влиянии уабаина в системном кровотоке животных на барьерные свойства кишки нет. Кроме того, известно, что уабаин способен подавлять воспалительную реакцию, которая была вызвана ЛПС, однако исследования in vivo также не многочисленны и данных о действии уабаина на кишечный эпителий и белки, определяющие его проницаемость, в условиях ЛПС-индуцированного повреждения отсутствуют.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Эксперименты с линией клеток IPEC-J2

В экспериментах использовали клеточную линию эпителия тощей кишки Braunschweig, свиньи IPEC-J2 (DSMZ, Germany), которая является нетрансформированной, неонатальной клеточной линией, и используется для изучения эпителиального транспорта и влияния различных веществ на множество параметров, отражающих функции эпителия (Zakrzewski et al., 2013a). Предварительно размороженную клеточную культуру посеяли в концентрации 3*10⁶ клеток/мл на специализированные мембраны (0,4 µм PCF, диаметр 12 мм). Культивирование клеток происходило В клеточной среде DMEM/F12 (BiochromGmbH, Berlin, Germany), содержавшую или не содержавшую уабаин октагидрат (Sigma Aldrich, Германия) в концентрации 10 нМ. Среда для выращивания клеток также содержала свиную сыворотку (10%), стабильный глутамин и раствор антибиотиков пенициллина и стрептомицина (1%). Культура клеток была выращена в инкубаторе CO_2 HeraeusHERA-cell 150 (KLPGmbH, Langenselbold, Germany) при температуре 37 °С и в атмосфере 5% CO₂. Замена среды проводилась каждые два-три дня.

2.1.1 Регистрация трансэпителиального сопротивления

Для оценки изменения барьерных свойств культуры клеток измеряли трансэпителиальное сопротивление (ТЭС) клеток. На 5-ый день после посева начинали регистрировать ТЭС при помощи усилителя EVOM (World Precision Instruments, США). Индифферентный электрод помещали в среду, омывающую клетки, что соответствовало базолатеральной стороне клеток. Другой электрод вводился с апикальной стороны. Значения ТЭС были нормированы на площадь мембраны (рис. 1). Сопротивление раствора вычиталось из полученных данных. ТЭС регистрировали каждые 2-3 дня.

2.1.2 Фармакологические агенты

На 24 день культивирования в клеточную линию добавляли липополисахарид (Sigma Aldrich, Germany) (10 мкг/мл) на 24 час с апикальной стороны, имитируя тем самым бактериальный контакт с клетками просвета кишки как в группы,

культивированные с уабаином, так и без него. Измерение ТЭС проводили через 0, 12 и 24 час после начала инкубации с ЛПС (рис. 1). Через 24 час клетки были заморожены или зафиксированы в 4%-м забуференном формалине для проведения дальнейшего молекулярного анализа.

2.1.3 Определение уровня белков плотных контактов методом Вестерн-блот

Для определения изменения уровня отдельных белков плотных контактов в культуре клеток, обработанных уабаином, а также после действия ЛПС, и сравнения их уровня относительно контрольных монослоев был использован метод Вестернблот в модификации Stain-Free. В технологии визуализации Stain-Free 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.

Выделение мембранных белков из культуры клеток. После завершения экспериментов с измерением ТЭС клеточные культуры промывали PBS с Ca²⁺ и Mg²⁺, добавляли 150 мкл лизирующего буфера (табл. 1), содержавшего детергенты для разрушения целостности структуры клеток, и ингибиторы протеаз cOmplete mini EDTA-free tablets (Roche, Германия) для предотвращения протеолиза белков. После добавления лизирующего буфера, монослои клеток соскребали скальпелем с фильтров, пипеткой собирали получившуюся суспензию в эппендорфы. Все процедуры с пробами выполнялись на льду. После инкубации в течение 30 минут, пробы помещали в ультразвуковую ванну на 8 секунд для разрушения клеточных стенок. После этого пробы гомогенизировали, дважды прогнав содержимое через инсулиновые шприцы.

Определение концентрации белка. Для определения концентрации белка в пробирках, содержавших фракцию мембранных белков, в отдельные ячейки на 96луночный планшет наносили по 5 мкл каждой пробы, 25 мкл смеси раствора сурфактанта и тартрата меди, а также 200 мкл разбавленного Фолинового реагента согласно протоколу Bio-Rad DC Protein Assay (Bio-Rad, США).



Рис. 1 Схема экспериментов с клеточной линией IPEC-J2

Для построения калибровочной кривой в отдельные лунки планшета наносили 5 мкл лизирующего буфера (нулевая точка) и по 5 мкл раствора стандартного бычьего сывороточного альбумина с концентрацией белка 125, 250, 500, 750 и 1000 мкг/мл (Thermo Scientific, США), к которым также добавляли растворы согласно протоколу Bio-Rad DC Protein Assay. В качестве контроля аутофлуоресценции использовали лунки с 5 мкл лизирующего буфера и растворы по протоколу Bio-Rad DC Protein Assay. После нанесения проб, их перемешивали на вортексе (5 секунд), инкубировали при комнатной температуре (15 мин), после чего помещали в мультимодальный ридер Perkin Elmer Enspire 2300 (PerkinElmer, США) для определения концентрации белка в пробах (длина волны 750 нм). На основе полученных данных рассчитывали объем каждой пробы для проведения электрофореза в Stain-Free геле.

Электрофорез в Stain-Free геле. Для разделения выделенной фракции белков по молекулярной массе использовался вертикальный электрофорез в Stain-Free геле с концентрацией полиакриламида 10%. Предварительно к пробам добавляли четырехкратный буфер Лэммли (Bio-Rad, CША), нагревали с помощью термошейкера (BioSan, Латвия) (5 мин; 95°С) и пипетировали в карманы геля. В отдельный карман геля наносили маркер молекулярных масс Page Ruler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific, США). Электрофорез проводился в буфере для электрофореза (табл. 1) при постоянном напряжении 150 В (60 мин; 22°С). Общую белковую нагрузку определяли на Stein-Free гелях с использованием УФ-излучения в системе визуализации Chemi-DocMPImagingSystem (Bio-Rad, CША).

Электроперенос белков с геля на мембрану. На следующем этапе белки под действием электрического тока переносились с полиакриламидного геля на поливинилденфторидные (PVDF) мембраны (Bio-Rad, CША). PVDF мембраны предварительно инкубировали в метаноле (5 мин; 22°C). Мокрый электроперенос происходил при постоянном напряжении 100 В в буфере для электропереноса (табл. 1) (90 мин; 22°C).

Иммуноокрашивание белков на PVDF мембране. После процедуры электропереноса PVDF мембраны инкубировали в блокирующем растворе (табл. 1) (120 мин, 22°C) для предотвращения неспецифического связывания антител. Далее PVDF мембраны инкубировались в течение ночи в растворе первичных кроличьих

или мышиных антител к клаудину-1, -3, -4, -5, -8 и трицеллюлина (табл. 2) (1:1000; 4°C). На следующем этапе PVDF мембраны промывали в TBST (табл. 1) (3 х 5 мин; 22°C) и инкубировали в растворе вторичных козьих антикроличьих или антимышиных антител (табл. 2) (1:1000; 45 мин, 22°C).

Денситометрия. Для последующей визуализации белков PVDF мембраны последовательно промывали в TBST (3 х 5 мин; 22°С) и TBS (табл. 1) (5 мин; 22°С), после чего наносили раствор Clarity WesternECLSubstrat (Bio-Rad, CША) (5 мин, 22°С). Детекция сигнала осуществлялась на анализаторе изображений Chemi-Doc XRS+ ImagingSystem (Bio-Rad, CША). Обнаруженные белки интереса нормализовали с помощью программного обеспечения Image-Lab 6.0 (Bio-Rad, США) как отношение к общей белковой нагрузке, измеренной в мембране для той же пробы.

2.1.4 Иммуногистохимическое окрашивание парафиновых срезов для изучения локализации белков плотных контактов.

После 25 дней инкубации клетки IPEC-J2 фиксировали в 4% формалине (Roti-Histofix, Carl Roth, Germany) в течение 1 часа, мембрану вырезали из вставки для культивирования клеток и помещали в гистологические кассеты. Мембраны с клеточными монослоями проводили через ряд спиртов возрастающей концентрации для обезвоживания с добавлением ксилола и заключали в парафин по стандартной методике (Marisa et al., 2011). Парафиновые блоки были нарезаны на срезы толщиной 5 мкм на микротоме Leica RM 2245 (Leica Microsystems, Германия). Перед окрашиванием срезы на предметных стеклах депарафинизировали в ксилоле и проводили через ряд спиртов нисходящей концентрации. Эпитопы были получены путем приготовления слайдов в 1 мМ ЭДТА-буфере (pH 8,0) в течение 45 минут. После пермеабилизации с помощью Triton X-100 (Carl Roth, Germany) и блокирования 5%-ной козьей сывороткой в течение 60 минут, предметные стекла инкубировали с первичными мышиными и кроличьими антителами (табл. 2) (1: 100) в течение 60 мин при 37°С. После стадии промывания в блокирующем растворе образцы инкубировали с козьими антимышиными и антикроличьими вторичными антителами Alexa Fluor-488 и -594 (1: 1000) и 40,6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI, 1: 5000) (табл. 2) в течение 60 мин при 37°С.

Раствор	Состав
Трис-НСІ	1,5 M Трис-буфер; 37% HCl до pH 7,5
Лизирующий буфер	1 М Трис-HCl; 1 М NaCl; 10% Triton-X- 100; 10% SDS
Буфер для электрофореза	10 мМ Трис-глицин; 10% SDS; pH 8,3
Буфер для электротрансфера TBS	10 мМ Трис-глицин; 0.01% SDS; 10% метанол; pH 8,3 10 мМ Трис-HCl; 150 mM NaCl; pH 7,5,
TBST	10 мМ Трис-HCl; 150 mM NaCl; 0,1% Tween 20; pH 7,5
Блокирующий раствор	10 мМ Трис-HCl; 150 mM NaCl; 5% сухое обезжиренное молоко

Таблица 1. Состав растворов, использованных для проведения Вестерн-блота

Таблица 2. Первичные и вторичные антитела, использованные для проведения Вестерн-блота

Антитело	№, производитель
Антитела против клаудина-1,	№51-9000, Invitrogen, CША
кроличьи, поликлональные	
Антитела против клаудина-3,	№34-1700, Invitrogen, CША
кроличьи, поликлональные	
Антитела против клаудина-4,	№32-9400, Invitrogen, CIIIA
кроличьи, поликлональные	
Антитела против клаудина-5,	№35-2500, Invitrogen, CША
мышиные, моноклональные	
Антитела против клаудина-8,	№40-0700Z, Invitrogen, CША
кроличьи, поликлональные	
Антитела против трицеллюлина,	№48-8400, Invitrogen, CША
кроличьи, поликлональные	
Антитела против cSrc,	№sc-8056, Santa Cruz Biotechnology Inc.,
мышиные моноклональные	США
Антитела против pcSrc (Tyr419),	№44660G, ThermoFisher Scientific, CША.
кроличьи, поликлональные	
Вторичные антикроличьи	№7074V, Cell Signaling, CША
антитела, HRP	
Вторичные антимышиные	№7076V, Cell Signaling, CША
антитела, HRP	
Вторичные антикроличьи	№A-11008, Invitrogen, CША
антитела, Alexa Fluor-488	
Вторичные антикроличьи	№A-11012, Invitrogen, CША
антитела, Alexa Fluor-594	
антитела, Alexa Fluor-594	
антитела, Alexa Fluor-594 Вторичные антимышиные	№A-11001, Invitrogen, CШA

Затем срезы монтировали с помощью ProTags Mount Fluor (Biocyc, Германия) и анализировали и визуализировали с использованием конфокального лазерного сканирующего микроскопа Zeiss 710 (Zeiss, Германия). Иммунофлуоресценцию для клаудина-1, -4, -5 и трицеллюлина регистрировали в зеленой области спектра (Alexa Fluor-488), клаудина-3 и -8 – в красной области спектра (Alexa Fluor-594).

Все вышеизложенные этапы экспериментов с клеточными культурами были проведены при участии докторанта Linda Droessler на базе Свободного Университета Берлина (Германия).

2.1.5 Определение уровня cSrc-киназы методом Вестерн-блот

Электрофорез в Stain-Free геле. Для разделения выделенной фракции белков по молекулярной массе использовался вертикальный электрофорез в 4-20%-ных градиентных полиакриламидных гелях Stain-Free (CriterionTM TGX Stain-freeTM precast gel, Bio-Rad, США). Предварительно гомогенаты клеточной линии нагревали с помощью термошейкера (BioSan, Латвия) (5 мин; 95°C) в четырехкратном буфер Лэммли (Bio-Rad, США) и затем пипетировали в карманы геля. Общую белковую нагрузку определяли на Stain-Free гелях с использованием УФ-излучения в системе визуализации с600 (Azur Biosystems, США).

Электроперенос белков с геля на мембрану. Белки переносили на мембраны PVDF, предварительно активированные в метаноле (5 мин; 22°C). Мокрый электроперенос происходил при постоянном напряжении 100 В в буфере для электропереноса (табл. 1) (60 мин; 22°C).

Иммуноокрашивание белков на PVDF мембране. После электропереноса PVDF мембраны инкубировали в блокирующем буфере (табл. 1) (120 мин, 22°С) и в 5% бычьем сывороточном альбумине для предотвращения неспецифического связывания антител. Далее PVDF мембраны инкубировались в течение ночи в растворе первичных кроличьих антител против общей сSrc или мышиных антител против cSrc, фосфорилированной по Tyr419 (табл. 2) (1:1000; 4°С). После отмывки мембраны инкубировали со вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена (HRP) (1:4000; Dako, Дания; 45 мин, 22°С).

Денситометрия. Для последующей визуализации белков PVDF мембраны последовательно промывали в PBST (3 х 5 мин; 22°С) и PBS (табл. 3) (5 мин; 22°С) и детектировали сигнал с помощью набора для хемилюминесценции с улучшенным

спектром (ECL, Amersham, Великобритания). Обнаруженный в системе визуализации c600 (Azur Biosystems, США) общий cSrc белок нормализовали с помощью программы ImageJ (NIH, США) как отношение к общей белковой нагрузке, измеренной в мембране для той же пробы. Активацию cSrc путем фосфорилирования тирозина 419 определяли количественно как отношение фосфорилированного cSrc (pcSrc) к общему cSrc; т.е. pcSrc/cSrc.

Данный этап работы был проведен совместно с д.б.н. В.В. Кравцовой и д.б.н. В. Мачковым на базе Университета Орхуса, Дания.

2.2 Эксперименты с животными

В экспериментах использовали самцов крыс Вистар массой 200-250 г (виварий Института физиологии им И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург). Животных содержали в условиях вивария на стандартном рационе со свободным доступом к пище и воде. Исследования выполняли в соответствии со стандартами, принятыми организациями по работе с лабораторными животными FELASA и RusLASA. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям этического комитета в области исследований на животных Санкт-Петербургского государственного университета (заключение № 131-03-5 от 13 декабря 2017 г. и заключение № 131-03-3 от 03 декабря 2020 г.). Во всех опытах использовали реактивы фирмы Sigma Aldrich (Германия), если не указано другого.

Для повышения концентрации уабаина в плазме крови основывались на протокол эксперимента, который был описан ранее (Kravtsova et al., 2020). В соответствии с протоколом этого эксперимента крысам ежедневно внутрибрюшинно вводили уабаин в дозе 1 мкг/кг в течение 4 дней. В качестве контроля использовали группу животных, которым по той же схеме вводили физиологический раствор. На 5 день крыс декапитировали и извлекали ткань тощей и толстой кишки. Такой способ введения уабаина приводит к повышению его концентрации в плазме по сравнению с интактными животными в 2 раза.

Для исследования функциональных взаимодействий Na,K-ATФазы и белков плотных контактов в условиях функционального нарушения, крысам вводили уабаин в дозе, как описано ранее. На 4-ый через 2 часа после инъекции уабаина крысам внутрибрюшинно (в/б) вводили липополисахарид (1 мг/кг). Через 24 часа крыс декапитировали и извлекали ткань тощей и толстой кишки (рис. 2).

После извлечения ткани из крыс, ткань и толстой кишки монтировалась в камеру Уссинга для последующего изучения электрофизиологических характеристик и проницаемости ткани для флуоресцеина натрия. Часть сегментов ткани замораживали для дальнейшего проведения Вестерн-блота и фиксировали в 10%-м забуференном формалине.

2.2.1 Регистрация электрофизиологических характеристик в камере Уссинга

Камера Уссинга представляет собой экспериментальную установку, состоящую из нескольких элементов: камеры для ткани, состоящий из двух половин и имеющих внутреннее отверстие диаметром 4 мм, двух стеклянных резервуаров объемом 10 мл, четырех электродов (два токовых электрода и два электрода напряжения), предусилителя EVC3, многоканального фиксатора напряжения и тока EVC4000 (World Precision Instruments, США) (рис. 3).

Препарат ткани, полученный в ходе препаровки, вертикально монтируется между половинами камеры, таким образом, разделяя установку на две не сообщающиеся между собой половины. К каждой половине камеры подсоединяется стеклянный резервуар, который заполняется раствором Кребса-Рингера (в ммоль/л: 119 NaCl; 5 KCl; 1,2 MgCl₂·6H₂O; 25 NaHCO₃; 0,4 NaH₂PO₄·H₂O; 1,6 Na₂HPO₄·7H₂O; 1,2 CaCl₂). Резервуары также имеют водяную рубашку для поддержания температуры омывающего ткань раствора на 37°, а также порт для аэрации раствора газовой смесью карбоген (95% O₂, 5% CO₂). В каждой половине камеры имеется по одному токовому электроду и одному электроду напряжения, которые подключены Последний, предусилителю системы. В свою очередь, сообшается к с многоканальным фиксатором напряжения и тока (рис. 3).

Перед началом каждого эксперимента установку, собранную без ткани, заполняли раствором Кребса-Рингера, и, в соответствующих экспериментальным условиях (оксигенация карбогеном, температура 37°), сводили к нулю разность потенциалов на электродах напряжения и производили компенсацию электрического сопротивления раствора. Во всех экспериментах препараты ткани тощей и толстой кишки разрезали по линии брыжейки, и подготовленные препараты устанавливали в камеры. Ткань во всех опытах была ориентирована идентично.

Первые 5 минут после установки тканей необходимы для стабилизации электрофизиологических параметров и адаптации препаратов ткани к условиям эксперимента.

Регистрация электрофизиологических параметров осуществляется с интервалом в 5 минут в течение одного часа инкубации.

Регистрация разности потенциалов, которая описывает разность зарядов с апикальной и базолатеральной сторон эпителия, осуществляется в режиме «разности потенциалов» с помощью электродов напряжения. Регистрация тока короткого замыкания, который является отражением активного транспорта через эпителий, осуществляется в режиме «фиксации напряжения» при фиксации напряжения на ткани на величине 0 мВ, величина тока фиксировалась с помощью токовых электродов. Для определения сопротивления ткани, отражающее проницаемость ткани для различных соединений и электролитов, регистрировали отклонение напряжения в режиме «фиксации тока» при величине тока 10 мкА.

Трансэпителиальное сопротивление рассчитывалось по закону Ома:

 $R = \Delta U / I$

Полученную величину нормировали на площадь исследуемого участка ткани (0,13 см²).

2.2.2 Изучение проницаемости эпителия с помощью флуоресцеина натрия

Для изучения проницаемости парацеллюлярного пути для макромолекул в эпителии был использован флуоресцеин натрия. По данным литературы показано, что данная молекула, молекулярной массой 376 Да, является электронейтральной и диффундирует через эпителий по парацеллюлярному пути по концентрационному градиенту (Molenda et al., 2014).

Для изучения проницаемости эпителиального барьера ткани толстой и тощей кишки их устанавливали в камеры Уссинга, как описано ранее. После стабилизационного периода (10 минут), 50 мкл раствора с апикальной стороны заменяли на 50 мкл аналогичного раствора, содержавшего флуоресцеин натрия. Финальная концентрация флуоресцеина натрия в камере составила 100 мкмоль.



Рис. 2 Схема экспериментов работы с крысами



Рис. 3 Схема камеры для изучения электрофизиологических характеристик эпителия

V₁и V₂ – электроды напряжения; I₁и I₂– токовые электроды; EVC3 – предусилитель; EVC4000 – фиксатор тока и напряжения; Model 1250 – фазочувствительный усилитель.

Через 60 минут раствор с базолатеральной стороны ткани отбирали для определения концентрации, диффундировавшего через ткань флуоресцеина натрия. Для построения стандартной кривой использовались растворы с концентрацией флуоресцеина 1, 5, 10, 25, 50 мкмоль. Определение концентрации флуоресцеина натрия в пробах осуществлялось с помощью планшета и высокоразрешающего лазерного сканера Турhoon FLA 9500 (GE, США). Длина волны возбуждения лазера и поглощения составляла 473 и 510 нм, соответственно. Анализ полученных данных выполняли с помощью программы ImageJ. Значение коэффициента проницаемости (Рарр) рассчитывали по следующей формуле:

$$Papp = (dQ / dt) / (A \bullet C_0),$$

где dQ / dt – концентрация флуоресцеина натрия в растворе с серозной стороны через 60 минут инкубации (моль/с); A – площадь исследуемого участка ткани (см²); C₀ – концентрация флуоресцеина натрия в растворе с мукозной стороны в начальный момент времени (моль/л); Учитывая соотношение 1 л = 1000 см³, размерность проницаемости выражается в см/с.

Данный этап работы был выполнен с использованием оборудования Ресурсного центра «Развитие молекулярных и клеточных технологий» СПбГУ.

2.2.3 Изучение морфологических изменений препаратов кишки крысы с помощью световой микроскопии

Для оценки морфологических изменений структуры ткани фрагменты ткани тонкой и толстой кишки фиксировали в забуференном 10%-м формалине (3 ч, 22°С) с последующей длительной отмывкой от фиксатора сначала в проточной воде, а затем в фосфатном буфере (PBS) с Ca^{2+} и Mg^{2+} . Образцы проводили через ряд спиртов возрастающей концентрации для обезвоживания и заключали в парафин по стандартной методике. Полученные с помощью микротома Leica RM2265 (Германия) срезы толщиной 5 мкм помещали в водяную баню Leica HI1210 (Германия) в подогретую до 38 °С дистиллированную воду для расправления, и затем монтировали на предметные стекла, после чего оставляли на ночь в термостате при 37 °С для окончательной стабилизации срезов на стекле. На следующий день проводили процедуру депарафинизации ксилолом (2 x 5 мин; 22°С). Удаление ксилола осуществлялось с помощью повторной инкубации в абсолютном спирте и проведением через спирты нисходящей концентрации (2 х 5 мин; 22°С). После этого препараты отмывали в дистиллированной воде (2 х 5 мин; 22°С). Срезы окрашивали гематоксилином Майера (20 мин; 22°С), который обеспечивает окраску клеточных ядер красно-фиолетовым цветом. Последующая промывка стёкол со срезами под проточной водой изменяла окраску срезов до сине-фиолетовой за счёт создания слабощелочной среды. Далее следовала проводка в спиртах восходящей концентрации 70%, 80% и 96% (5 мин; 22°С) и окраска эозином на водной основе (5 мин; 22°С).

Монтаж покровных стекол на срезах осуществлялся при помощи Corbit-Balsam (Hecht, Германия). Оценку гистологической структуры ткани проводили на инвертированном световом микроскопе фирмы Leica DMI 6000 (Leica, Германия). Морфометрический анализ изображений проводили с помощью программы ImageJ.

Данный этап работы был выполнен с использованием оборудования Ресурсного центра «Развитие молекулярных и клеточных технологий» СПбГУ.

2.2.4 Определение уровня клаудинов методом Вестерн-блот

Определение уровня белков плотных контактов в ткани тощей и толстой кишки крысы при превентивном действии уабаина в условиях применения липополисахарида при помощи метода Вестерн-блот в модификации Stain-Free.

Выделение мембранных белков из ткани. На 5-ый день ткани тощей и толстой кишки иссекали и замораживали в эппендорфах при -80°С. К каждому фрагменту замороженной ткани добавляли 1 мл лизирующего буфера (табл. 1), содержавшего детергенты для разрушения целостности структуры клеток, и ингибиторы протеаз cOmplete mini tablets (Roche, Германия) для предотвращения протеолиза белков, а также стальные шарики. Процедуру гомогенизации ткани проводили при помощи механического гомогенизатора Retsch MM 400 (Retsch, Германия) с частотой 25 об/сек, 2 мин по 3 раза. После каждой гомогенизации ткань кратковременно помещали на лёд для исключения размораживания ткани. Полученные суспензии помещали на лёд на 15 мин для дальнейшего лизирования. Через 15 мин эппендорфы полученные белковые супернатанты отбирали в новые эппендорфы для дальнейшего определения концентрации белка.

Определение концентрации белка. Для определения концентрации белка в пробирках, содержавших фракцию мембранных белков использовали реагенты набора Pierce[™] BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, США). В отдельные ячейки на 96-луночный планшет наносили по 25 мкл каждой пробы и по 200 мкл предсмешанных растворов бицинхониновой кислоты (Реагент В+ Реагент А, 50:1). Для построения калибровочной кривой в отдельные лунки планшета наносили 25 мкл лизирующего буфера (нулевая точка) и по 25 мкл раствора стандартного бычьего сывороточного альбумина с концентрацией белка 25, 50, 125, 250, 500, 750, 1000 и 2000 мкг/мл (Thermo Scientific, США), к которым также добавляли растворы согласно протоколу PierceTM BCA Protein Assay Kit. В качестве контроля аутофлуоресценции использовали лунки с 25 мкл лизирующего буфера и растворы по протоколу PierceTM BCA Protein Assay Kit. После нанесения проб, их перемешивали на вортексе (5 секунд), инкубировали в термостате при температуре 37°С (30 мин), после чего помещали в мультимодальный ридер SPECTROstar® Nano (BMG LABTECH, Германия) для определения концентрации белка в пробах (длина волны 562 нм). На основе полученных данных рассчитывали объем каждой пробы для проведения электрофореза в Stain-Free-геле.

Электрофорез в Stain-Free геле. Для разделения выделенной фракции белков по молекулярной массе использовался вертикальный электрофорез в Stain-Free геле с концентрацией полиакриламида 10%. Предварительно к пробам добавляли четырехкратный буфер Лэммли (Bio-Rad, CША), нагревали с помощью термошейкера (5 мин; 95°С) и пипетировали в карманы геля. В отдельный карман геля наносили маркер Page Ruler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific, CША). Электрофорез проводился в буфере для электрофореза (табл. 1) при постоянном напряжении 100 В (60 мин; 22°С). Общую белковую нагрузку определяли на Stain-Free гелях с использованием УФ-излучения в системе визуализации Chemi-Doc XRS+ ImagingSystem (Bio-Rad, CША).

Электроперенос белков с геля на мембрану. На следующем этапе белки под действием электрического тока переносились с полиакриламидного геля на поливинилденфторидные (PVDF) мембраны (Bio-Rad, CША). PVDF мембраны предварительно инкубировали в метаноле (5 мин; 22°C). Полусухой электроперенос проводили с использованием система быстрого блоттинга Trans-Blot Turbo при помощи протокола Mixed MW (7 мин, 2.5 A, 25 B) в буфере для электропереноса (табл. 2).

Иммуноокрашивание белков на PVDF мембране. После процедуры электропереноса PVDF мембраны инкубировали в блокирующем растворе (табл. 2) (120 мин, 22°C) для предотвращения неспецифического связывания антител. Далее PVDF мембраны инкубировали в течение ночи в растворе первичных кроличьих антител к клаудину-1, -3, -8, окклюдина и трицеллюлина и мышиных к клаудину-2 и -5 (табл. 3) (1:1000; 4°C). На следующем этапе PVDF мембраны промывали в PBST (табл. 4) (3 х 5 мин; 22°C) и инкубировали в растворе вторичных козьих антикроличьих и антимышиных антител (табл. 3) (1:1000; 45 мин, 22°C).

Денситометрия. Для последующей визуализации белков PVDF мембраны последовательно промывали в PBST (3 х 5 мин; 22°С) и PBS (табл. 1) (5 мин; 22°С), после чего наносили раствор Clarity WesternECLSubstrat (Bio-Rad, CША) (5 мин, 22°С). Детекция сигнала осуществлялась на анализаторе изображений Chemi-Doc XRS+ ImagingSystem (Bio-Rad, CША). Обнаруженные белки интереса нормализовали с помощью программного обеспечения Image-Lab 6.0 (Bio-Rad, США) как отношение к общей белковой нагрузке, измеренной в мембране для той же пробы.

Данный этап работы был выполнен с использованием оборудования Ресурсного центра «Развитие молекулярных и клеточных технологий» СПбГУ.

2.3 Статистическая обработка полученных результатов

Статистическую обработку данных выполняли с помощью программы GraphPadPrism v.8 (GraphPad Software, CIIIA). Обработка результатов сравнительного анализа ТЭС в клеточной линии IPEC-J2, ТЭС и ток «короткого замыкания» ткани тощей и толстой кишки крысы при действии уабаина и липополисахарида, в которых использовались связанные выборки и которые соответствовали нормальному распределению, происходила с использованием двухфакторного дисперсионного анализа с поправкой Даннета. Морфометрия ткани тощей и толстой кишки происходила с использованием однофакторного с поправкой Тьюки. Тест Д'Агостино-Пирсона дисперсионного анализа использовался для оценки нормальности распределения. Обработка данных после проведения Вестерн-блот анализа белков плотных контактов производилась с использованием непараметрического теста Краскал-Уоллиса. Непараметрический тест Манна-Уитни использовался для обработки данных после Вестерн-блота протеинкиназы Src. Данные представлены в виде средних значений ± ошибка среднего. Уровень значимости р < 0.05 принимался как статистически значимый.

Раствор	Состав
Трис-НСІ	1 М Трис-буфер; 37% HCl до pH 7,4
Лизирующий буфер	1 M Трис-HCl; 1 M NaCl; 10% Triton-X- 100; 10% SDS
Буфер для электрофореза	10 мМ Трис-глицин; 10% SDS; pH 8,3
Буфер для электротрансфера	10 мМ Трис-глицин; 0.01% SDS; pH 8,3
PBS	1.47 мМ КH ₂ PO ₄ ; 4.29 мМ Na ₂ HPO ₄ *7H ₂ O; 137 мМ NaCl; 2.68 мМ KCl; pH 7,5,
PBST	1.47 мМ КН2РО4; 4.29 мМ Na2HPO4*7H2O; 137 мМ NaCl; 2.68 мМ KCl; 0,1% Tween 20; pH 7,5
Блокирующий раствор	1.47 мМ КН2РО4; 4.29 мМ Na2HPO4*7H2O; 137 мМ NaCl; 2.68 мМ KCl; 5% сухое обезжиренное молоко

Таблица 3. Состав растворов, использованных для проведения Вестерн-блота

Таблица 4. Первичные и вторичные антитела, использованные для проведения Вестерн-блота

Антитело	№, производитель
	No71 7800 Invitragen CIIIA
поликлональные	M⊈/1-/800, Invitrogen, CIIIA
	No32 5600 Invitrogen CIIIA
моноклональные	
Антитела против клаудина-3, кроличьи, поликлональные	№34-1700, Invitrogen, CIIIA
Антитела против клаудина-5, мышиные,	№35-2500, Invitrogen, CША
моноклональные	
Антитела против клаудина-8, кроличьи, поликлональные	№40-0700Z, Invitrogen, CШA
Антитела против окклюдина, кроличьи, поликлональные	№71-1500, Invitrogen, CIIIA
Антитела против трицеллюлина, кроличьи, поликлональные	№48-8400, Invitrogen, CША
Вторичные антикроличьи антитела, HRP	№ AB205718, Abcam, UK
Вторичные антимышиные антитела, HRP	№ AB205719, Abcam, UK

ГЛАВА 3. БАРЬЕРНЫЕ СВОЙСТВА КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ IPEC-J2 ПРИ ДЕЙСТВИИ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА В УСЛОВИЯХ ДЛИТЕЛЬНОГО ПРИМЕНЕНИЯ УАБАИНА

3.1 Изменение трансэпителиального сопротивления монослоя клеточной линии IPEC-J2 при действии липополисахарида в условиях длительного применения уабаина

Изменение трансэпителиального сопротивления клеточной линии IPEC-2 при *действии уабаина*. Во время инкубации клеточной линии IPEC-J2 контрольной группы наблюдалось постепенное увеличение ТЭС с 87 ± 8 до 3289 ± 125 Ом·см² (n = 12), зарегистрированное соответственно на 5-й и 22-й день культивирования. Дальнейшая инкубация клеток не приводила к значимым изменениям ТЭС, что свидетельствовало о достижении клетками конфлюентности за счет формирования межклеточных контактов, в первую очередь плотных контактов. При добавлении в среду инкубации уабаина в концентрации 10 нМ (n = 12), начиная с момента культивирования клеток на мембране, динамика увеличения ТЭС изменилась. Уабаин на начальных этапах формирования монослоя замедлял прирост ТЭС. Этот эффект проявлялся уже к 10-му дню инкубации, в который ТЭС в этой группе было достоверно меньше по сравнению с контролем, составляя 76 ± 4 Ом·см² (р < 0.05, двухфакторный дисперсионный анализ). Однако это воздействие с течением времени уменьшалось, и к 19-му дню инкубации этот параметр не имел отличий от группы контроля. ТЭС было равно 2162 ± 106 и 2090 ± 60 Ом·см² в контрольной и опытной группах, соответственно. Важно подчеркнуть, что при дальнейшей инкубации клеток с уабаином динамика изменения ТЭС практически совпадала с таковой для контрольной группы клеток линии IPEC-J2 (рис. 4).

Изменение трансэпителиального сопротивления монослоя клеточной линии *IPEC-J2 при апикальном действии липополисахарида*. Исходное значение ТЭС в группе, которая была инкубирована с липополисахаридом, не отличалось от контрольной группы, и составляло 2937 ± 301 Ом·см². После внесения эндотоксина в концентрации 10 мкг/мл в среду инкубации клеток IPEC-J2 с апикальной стороны через 12 час наблюдали снижение ТЭС. Дальнейшая инкубация клеток (24 час) с липополисахаридом приводила к достоверному снижению ТЭС до величины 2583 ± 258 Ом·см² (n = 6; p < 0.001; двухфакторный дисперсионный анализ). Это снижение также было достоверно по сравнению с величиной ТЭС в этой временной точке в контрольной группе, которая была равна 3347 ± 115 Ом·см² (рис. 4) (n = 6; p < 0.001; двухфакторный дисперсионный анализ).

Изменение трансэпителиального сопротивления клеточной линии IPEC-J2 при действии липополисахарида на фоне уабаина. Внесение липополисахарида в среду инкубации клеток IPEC-J2, которые с момента высевания подвергались действию уабаина в концентрации 10 нМ, не привело к изменению величины ТЭС. Через 24 час она составляла $3064 \pm 170 \text{ Ом} \cdot \text{см}^2$, не отличаясь от ТЭС контрольной группы ($3347 \pm 115 \text{ Ом} \cdot \text{см}^2$), а также от ТЭС в группе Уабаин ($3162 \pm 130 \text{ Ом} \cdot \text{см}^2$) (рис. 4). Полученные данные свидетельствуют, что после формирования слоя клеток уабаин в наномолярной концентрации не влияет на проницаемость эпителия и предотвращает изменение функциональных свойств эпителия, вызванных применением липополисахарида.

3.2 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. Для изучения молекулярного состава плотных контактов методом Вестерн-блот в клеточной линии IPEC-J2 были проанализированы клаудин-1, -3, -4, -5, и -8, а также трицеллюлин в контрольной и опытных группах. Вестерн-блот подтвердил наличие всех взятых для анализа белков в плазматической мембране клеточной линии IPEC-J2 кДа, а трицеллюлин – с массой 64 кДа (рис. 5).

При анализе результатов Вестерн-блота для отдельных клаудинов была выявлена разница в интенсивности сигнала в различных экспериментальных группах. Денситометрия показала, что уровень клаудина-1 и -5 увеличивался при действии уабаина в концентрации 10 нМ по сравнению с контролем (n = 6; p < 0.05, тест Краскал-Уоллиса) (рис. 5). Содержание клаудина-3, -4, -8 и трицеллюлина не имело статистически значимого отличия от контроля (рис. 5).



Рис. 4 Изменение трансэпителиального сопротивления (ТЭС) в клеточной линии IPEC-J2 при действии липополисахарида (10 мкг/мл) в условиях длительного применения уабаина (10 нМ)

Стрелкой обозначено добавление липополисахарида.

- p < 0.05, ## - p<0.01, ### - p<0.001 – группа Уабаин по сравнению с контролем; ***p<0.001 – группа ЛПС по сравнению с контролем и группой Уабаин;
\$ - p<0.05 – группа ЛПС по сравнению с группой Уабаин+ЛПС; n = 6 для каждой группы. Двухфакторный дисперсионный анализ.





Верхние панели – репрезентативные иммуноблоты; значения контроля приняты за 100 %.

– р < 0.05 по сравнению с соответствующим контролем; n = 6 для каждой группы. Тест Краскал-Уоллиса.



Рис. 6 Отношение уровня белков сигнального пути – cSrc и pcSrc - в клеточной линии IPEC-J2 (контроль) и при длительном действии уабаина (10 нМ)

Верхние панели – репрезентативные иммуноблоты.

– p < 0.05 по сравнению с соответствующим контролем; n = 6 для каждой группы. Тест Манна-Уитни.



Рис. 7 Изменение уровня клаудинов в клеточной линии в клеточной линии IPEC-J2 (контроль) при действии ЛПС (10 мкг/мл) в условиях длительного применения уабаина (10 нМ)

Верхние панели – репрезентативные иммуноблоты; значения контроля приняты за 100 %.

- p < 0.05 – группа Уабаин по сравнению с контролем; * - p < 0.05 – группа ЛПС по сравнению с контролем; \$ - p < 0.05, \$\$ - p < 0.01 – группа ЛПС по сравнению с группой Уабаин+ЛПС; & - p < 0.05 – группа Уабаин+ЛПС по сравнению с контролем; n = 4-6. Тест Краскал-Уоллиса.

3.3 Изменение уровня Src-киназы и активированной Src-киназы в клеточной линии IPEC-J2 в условиях длительного применения уабаина

Одним из предполагаемых механизмов регуляции белков плотных котактов уабаином является активация Src-киназы, вызванная образованием сигнального комплекса cSrc-Na,K-ATФаза (Rincon-Heredia, 2014) Для выяснения возможного сигнального пути изменения белков плотных контактов в клеточной линии IPEC-J2 были проанализированы активированная Src-киназа и ее общий уровень. Было показано, что уровень активированной аутофосфорилированием по тирозину Src-киназы был значительно выше при инкубации с уабаином по сравнению с контролем (n = 6, p < 0.05 тест Манна-Уитни) (рис 6). Важно отметить, что уровень общего cSrc не был затронут хроническим воздействием уабаина. Это позволяет сделать вывод, что повышенная активация cSrc является именно результатом запуска сигналинга, который был опосредован уабаином, а не изменениями общего уровня cSrc. 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.

3.4 Изменение уровня белков плотных контактов в клеточной линии IPEC-J2 при действии липополисахарида в условиях длительного применения уабаина

Известно, что действие липополисахарида на клетки IPEC-J2 вызывает снижение клаудина-1 и -3 (Yan et al., 2017). Поэтому при проведении опытов с использованием липополисахарида и липополисахарида на фоне уабаина был проведен анализ изменения уровня клаудина-1 и -5, а также клаудина-3. При инкубации клеток в течение 24 часов с липополисахаридом, который был добавлен с апикальной стороны клеток, было выявлено, что эндотоксин достоверно уменьшал уровень клаудина-1 и -3 (n = 4, p < 0.05, тест Краскал-Уоллиса) (рис. 7). Предварительное культивирование клеточной линии IPEC-J2 в среде, содержащей уабаин в концентрации 10 нМ, предотвращало снижение уровня клаудина-1 и -3 при действии липополисахарида (рис. 7). Содержание клаудина-5 в данных условиях не изменялось. Таким образом, уабаин в наномолярной концентрации изменяет уровень белков плотных контактов клеточной линии IPEC-J2 и предотвращает уменьшение их уровня, вызываемое липополисахаридом.
3.5 Изучение локализации клаудинов в клеточной линии IPEC-J2 при действии липополисахарида в условиях длительного применения уабаина

Основной задачей иммунофлуоресцентного исследования было изучение локализации и возможного перераспределения белков плотных контактов в клеточной линии IPEC-J2 при действии уабаина (10 нМ) и липополисахарида (10 мкг/мл).

Иммунофлуоресцентный сигнал в контрольных образцах был обнаружен для клаудина-1, -3, -5, -8 и трицеллюлина. Поперечные срезы культивированных клеток давали типичную картину, напоминающую соты, что свидетельствует о формировании конфлюентного монослоя клеток, соединенных между собой плотными контактами. Визуализация всех исследованных белков подтверждало формирование плотных контактов как многокомпонентных белковых структур.

Действие уабаина не вызывало заметного перераспределения белков плотных контактов в пределах клеток. Основной сигнал идентифицировался по линии контакта соседних клеток (рис. 8).

Внесение в среду инкубации липополисахарида привело к существенному изменению сигнала для клаудина-1. Кроме уменьшения общей интенсивности сигнала отмечалась дефрагментация плотных контактов. Вместо сплошной линии, соответствующей соединению клеток в единый пласт, появлялись отдельные точки, что говорит о перераспределении плотных контактов (рис. 9). Сигнал клаудина-3 также отличался по интенсивности сигнала, но характер распределения сигнала сохранился. Для клаудина-5 не было отмечено каких-либо изменений.

Предварительное применение уабаина перед липополисахаридом восстанавливало картину распределения сигнала, характерную для контрольной группы. Появился четкий сигнал по границе клеток для клаудина-1. Отмечалось усиление интенсивности свечения для клаудина-3. Картина для клаудина-5 не изменялась (рис. 9). На основании полученных результатов о характере иммунофлуоресценции можно сделать вывод о том, что изменения белков плотных контактов локализовано в пределах этих структур. Таким образом, уабаин предотвращает изменение перераспределения клаудина-1 и -3, вызыванное применением ЛПС.



Рис. 8 Распределение клаудина-1, -3, -4, -5, -8 и трицеллюлина в клеточной линии IPEC-J2 при длительном действии уабаина (10 нМ)

Красное свечение — клаудин-3, -8; зеленое свечение – клаудин-1, -4, -5 и трицеллюлин; синее свечение — окраска ядер флуоресцентным красителем DAPI. Масштабная линейка– 10 мкм.



Рис. 9 Распределение клаудина-1, -3 и -5 в клеточной линии IPEC-J2 при действии ЛПС (10 мкг/мл) в условиях длительного применения уабаина (10 нМ)

Красное свечение — клаудин-3; зеленое свечение – клаудин-1 и клаудин-5; синее свечение — окраска ядер флуоресцентным красителем DAPI.

Масштабная линейка- 10 мкм.

ГЛАВА 4. БАРЬЕРНЫЕ СВОЙСТВА ТОЩЕЙ И ТОЛСТОЙ КИШКИ КРЫСЫ ПРИ ДЕЙСТВИИ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА В УСЛОВИЯХ 4-Х ДНЕВНОГО ПРИМЕНЕНИЯ УАБАИНА

4.1 Изменение массы тела животных при действии ЛПС в условиях 4-х дневного применения уабаина

В группе Контроль, которой вводили физиологический раствор, на протяжении пяти дней масса животных достоверно не изменялась. Ежедневные инъекции уабаина (1 мкг/кг) в группе Уабаин также не приводили к значимым изменениям массы тела животных. До введения липополисахарида масса тела животных из группы ЛПС, достоверно не изменялась. Однако после однократной инъекции эндотоксина (1 мг/кг) в течение 24 часов произошло достоверное снижение массы тела крыс по сравнению с контролем (р < 0.001, тест Краскал-Уоллиса). 4-х дневное введение уабаина перед последующей инъекцией липополисахарида вызвало также уменьшение массы тела животных из группы Уабаин+ЛПС (рис. 10).

4.2 Изменение электрофизиологических параметров тощей и толстой кишки при действии ЛПС в условиях 4-х дневного применения уабаина

Изменение электрофизиологических параметров в тонкой кишке. 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 (n = 12) она была равна 46 ± 3 Ом·см² и на 60-ой минуте - 41 ± 4 Ом·см². В группе Уабаин (n = 8) величина ТЭС составляла на 5-ой минуте 34 ± 4 Ом·см², достигая 36 ± 5 Ом·см² к 60-й минуте регистрации. Введение эндотоксина в дозе 1 мг/кг на 24 час (n = 5) достоверно снижало ТЭС в тощей кишке по сравнению с контролем (p < 0.05 и p < 0.001, двухфакторный дисперсионный анализ) – ТЭС к 5-й минуте составляло 26 ± 4 Ом·см² и 28 ± 6 Ом·см² на 60-й минуте регистрации. В группе Уабаин+ЛПС (n = 6) ТЭС составляло 42 ± 5 Ом·см² к 5-й мин, достигая 46 ± 6 Ом·см² к 60 минуте, и достоверно отличалось от значений в группе, получавшей только инъекции ЛПС (p < 0.05 и p < 0.001, двухфакторный дисперсионный анализ) (рис. 11, A).



Рис 10 Изменение массы тела крыс при действии ЛПС (1 мг/кг) в условиях 4х дневного введения уабаина (1 мкг/кг)

*** - p < 0.001 – группа ЛПС по сравнению с контролем и группой Уабаин; &&& - p < 0.001 – группа Уабаин+ЛПС по сравнению с контролем и группой Уабаин; n = 5. Тест Краскал-Уоллиса. Сопоставление на 10-ой минуте регистрации величин ТЭС показывает, что уабаин предотвращает снижение ТЭС, вызванное введением липополисахарида. В контрольной группе ТЭС составляло 47 ± 4 Ом·см², в группе Уабаин - 36 ± 4 Ом·см², в группе ЛПС - 28 ± 4 Ом·см² и 44 ± 5 Ом·см² в группе Уабаин+ЛПС (рис. 11, В).

Динамика тока «короткого замыкания» в тощей кишке в группах контроль, Уабаин и Уабаин+ЛПС была стабильной в течении 60 минут регистрации, однако в группе ЛПС было выявлено существенное снижение от начала к концу регистрации. 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 4-х дневном введении не вызывал достоверных изменений тока «короткого замыкания»- на 5-й минуте данный параметр составлял 42 ± 6 мкА, и на 60-й минуте - 39 ± 6 мкА (рис. 11, Б). Ha 5-й минуте группы животных, предварительно инъецированных V липополисахаридом, зарегистрировали величину 99 ± 16 мкА, достоверно большую, чем в группе Контроль на этой же минуте (p < 0.001, двухфакторный дисперсионный анализ). На 60-й минуте в данной группе животных ток «короткого замыкания» в тощей кишке составлял 18 ± 4 мкА и уже не имел достоверных отличий от контроля (рис. 11, Б). После введения липополисахарида на фоне 4-х дневного применения уабаина в тощей кишке на 5-й минуте регистрации величина тока «короткого замыкания» составляла 54 ± 6 мкА, и была достоверно больше по сравнению с контрольной группой и достоверно меньше по сравнению с группой ЛПС (р < 0.01 и р < 0.001, соответственно, двухфакторный дисперсионный анализ). В конце регистрации на 60-й минуте ток «короткого замыкания» в группе Уабаин+ЛПС не отличался от других групп животных (рис. 11, Б).

Сравнение значениий тока «короткого замыкания» на 10-й минуте показывает, что предварительное введение уабаина предотвращает существенное увеличение данного параметра при действии липополисахарида. Так, величина данного параметра в группе Контроль составляла – 25 ± 4 мкА, в группе Уабаин - 39 ± 5 мкА, в группе ЛПС - 87 ± 12 мкА, в группе Уабаин+ЛПС - 51 ± 4 мкА (рис. 11, Г).



Рис. 11 Изменение электрофизиологических параметры тощей кишки крысы при действии ЛПС (1 мг/кг) в условиях 4-х дневного введения уабаина (1 мкг/кг)

А - трансэпителиальное сопротивление, Б - ток «короткого замыкания» тощей кишки крысы в течении 60 мин регистрации; В - трансэпителиальное сопротивление, Г - ток «короткого замыкания» на 10-й мин регистрации

* - p < 0.05,** - p < 0.01, *** - p < 0.001 – группа ЛПС по сравнению с контролем; \$ - p < 0.05, \$\$ - p < 0.01, \$\$\$ - p<0.001 – группа Уабаин+ЛПС по сравнению с ЛПС; && - p<0.01 – группа Уабаин+ЛПС по сравнению с контролем; n = 19-35. Двухфакторный дисперсионный анализ

Изменение электрофизиологических параметров в толстой кишке. В толстой кишке на протяжении 60 минут регистрации динамика ТЭС была стабильной во всех группах. Величина ТЭС в контрольной группе (n = 12) составляла к 5-й минуте - 58 \pm 4 Ом·см², достигая 48 \pm 3 Ом·см² к 60-й минуте регистрации. 4-х дневное предварительное введение уабаина (n = 8) не вызывало достоверных изменений ТЭС по сравнению с контролем - к 5-й минуте регистрации данный параметр составлял 54 \pm 4 Ом·см² и 47 \pm 3 Ом·см² на 60-й минуте (рис. 12, А). Введение липополисахарида в дозе 1 мг/кг на 24 час (n = 5) не изменяло ТЭС по сравнению с контролем – ТЭС к 5-й минуте составляло 69 \pm 5 Ом·см² (p < 0.05, двухфакторный дисперсионный анализ),и постепенно снижалось, достигая 50 \pm 3 Ом·см² к 60-й минуте регистрации. 4-х дневное введение уабаина перед липополисахаридом также не влияло на изменение ТЭС по сравнению с контролем в начале регистрации его величина составляла 69 \pm 4 Ом·см² к 5-й минуте (p < 0.01, двухфакторный дисперсионный анализ) и снижалось до 58 \pm 3 Ом·см² к 60 минуте (рис. 12, А).

Введение уабаина перед инъекцией липополисахарида не приводило к уменьшению ТЭС на 10-й минуте регистрации в толстой кишке: в контрольной группе данный параметр составлял 56 ± 4 Ом·см², в группе Уабаин - 54 ± 4 Ом·см², в группе ЛПС - 68 ± 4 Ом·см², в группе Уабаин+ЛПС - 70 ± 4 Ом·см².

Динамика тока «короткого замыкания» в толстой кишке оставалась неизменной на протяжении 60 минут регистрации в группах контроль и Уабаин. В контрольной группе значение данного параметра к 5-й минуте составляло 14 ± 2 мкА и 12 ± 2 мкА было зарегистрировано на 60-й минуте регистрации. Уабаин в дозе 1 мкг/кг при 4-х дневном введении не вызывал достоверных изменений тока «короткого замыкания» – на 5-й минуте он равнялся 18 ± 6 мкА, а на 60-й минуте - 17 ± 2 мкА (рис 12, Б). Ток «короткого замыкания» в группах ЛПС и Уабаин+ЛПС постепенно снижался от 5-й к 60-й минуте регистрации. На 5-й минуте у группы ЛПС зарегистрировали величину 34 ± 7 мкА, достоверно большую, чем в группе Контроль на этой же минуте (р < 0.01, двухфакторный дисперсионный анализ). Снижение тока «короткого замыкания» происходило до 40-й минуты регистрации, в дальнейшем значения не менялись. На 60-й минуте в данной группе животных ток «короткого замыкания» составлял 21 ± 5 мкА и уже не имел достоверных отличий от контроля (рис. 12, Б). На фоне 4-х дневного введенного уабаина инъекции липополисахарида в толстой кишке на 5-й минуте также вызывали достоверное увеличение тока «короткого замыкания» по сравнению с контролем (р < 0.001, двухфакторный дисперсионный анализ); его величина составляла 41 ± 6 мкА. В конце регистрации на 60-й минуте ток «короткого замыкания» в группе Уабаин+ЛПС не отличался от других групп животных – его величина составляла - 19 ± 3 мкА (рис 12, Б).

При сравнении данных тока «короткого замыкания» на 10-й минуте регистрации в толстой кишке было продемонстрировано, что 4-х дневное введение уабаина не вызывает уменьшение данного параметра после введения липополисахарида. Величина тока «короткого замыкания» в группе Контроль составляла - 13 ± 2 мкА, в группе Уабаин - 17 ± 5 мкА, в группе ЛПС - 30 ± 6 мкА, в группе Уабаин+ЛПС - 39 ± 5 мкА (рис 12, Г).

4.3 Изменение проницаемости тощей и толстой кишки крысы при действии ЛПС в условиях 4-х дневного применения уабаина

Исходное значение проницаемости для флуоресцеина натрия в эпителии тощей кишки составляло $4.4 \cdot 10^{-4}$ см/с (n = 5). Для толстой кишки данный параметр был в 2 раза меньше, составляя и $2.4 \cdot 10^{-4}$ см/с (n = 6). Разница в проницаемости тощей и толстой кишки обусловлена разными барьерными свойствами сегментов.

4-х дневное введение уабаина в дозе 1 мкг/кг не влияло на изменение проницаемости в ткани тощей кишки. В условиях введения липополисахарида наблюдали достоверное увеличение проницаемости в тощей кишке почти в 2 раза по сравнению с контролем (р < 0.05, однофакторный дисперсионный анализ). При сочетанном действии уабаина и липополисахарида величина проницаемости снижалась до уровня контроля и была достоверно меньше проницаемости в группе ЛПС (р < 0.05, однофакторный дисперсионный анализ) (рис. 13, А). Проницаемость для флуоресцеина натрия в толстой кишке при всех типах воздействия не меняется по сравнению с контролем (рис. 13, Б). Таким образом, ЛПС вызывает классические по литературным данным изменения в тощей кишке крысы. Длительное предварительное применение уабаина предотвращает данные изменения. Ткань толстой кишки в целом оказалась резистентной ко всем типам воздействия.



Рис. 12 Изменение электрофизиологических параметры толстой кишки крысы при действии ЛПС (1 мг/кг) в условиях 4-х дневного введения уабаина (1 мкг/кг)

А - трансэпителиальное сопротивление, Б - ток «короткого замыкания» толстой кишки крысы в течении 60 мин регистрации; В - трансэпителиальное сопротивление, Г - ток «короткого замыкания» на 10-й мин регистрации

* - p < 0.05,** - p < 0.01– группа ЛПС по сравнению с контролем; & - p < 0.05,
&& - p < 0.01 – группа Уабаин+ЛПС по сравнению с контролем; n = 19-35.
Двухфакторный дисперсионный анализ.



Рис. 13 Проницаемость для флуоресцеина натрия в тощей (А) и толстой (Б) кишке крысы при действии ЛПС (1 мг/кг) в условиях 4-х дневного введения уабаина (1 мкг/кг)

* - р < 0.05 – группа ЛПС по сравнению с контролем;
 \$ - р < 0.05 – группа Уабаин+ЛПС по сравнению с ЛПС;
 n = 10-20. Однофакторный дисперсионный анализ.

4.4 Морфология эпителия тощей и толстой кишки крысы при действии липополисахарида в условиях 4-х дневного применения уабаина

У контрольных животных гистологическое строение стенки тощей кишки и эпителия соответствовало общепринятым параметрам – отмечались хорошо идентифицируемые ворсинки и крипты (рис. 14, А). Применение уабаина и липополисахарида привело к разнонаправленным изменениям в строении эпителия. Общий эффект от применения уабаина проявлялся в увеличении толщины эпителиального слоя (рис. 14, Б). Об этом свидетельствовало, во-первых, достоверное увеличение глубины крипт и уменьшение их диаметра (p < 0.001 и p < 0.001, соответственно, однофакторный дисперсионный анализ) (рис. 15, В, Г). Вовторых, длина ворсинок обнаруживала тенденцию к ее увеличению по сравнению с контролем (p = 0.08, однофакторный дисперсионный анализ) при действии данного гликозида (рис. 15, А). Кроме того, отмечалось достоверное уменьшение диаметра ворсинок на 30 мкм по сравнению с контролем (p < 0.001, однофакторный дисперсионный анализ) (рис. 15, Б).

Общим эффектом воздействия липополисахарида на ткань тощей кишки являлось уменьшение размеров ворсинки и длины эпителия в целом (рис. 14, В). При действии эндотоксина происходило достоверное, почти двукратное, уменьшение длины и диаметра ворсинок (p < 0.001, однофакторный дисперсионный анализ) (рис. 15, А, Б), а также значительное (на 35 %) уменьшение глубины крипты и ее диаметра (p < 0.001 и p < 0.001, соответственно, однофакторный дисперсионный анализ) (рис. 15, В, Г).

Предварительное 4-х дневное введение уабаина перед применением липополисахарида приводило к снижению некоторых эффектов липополисахарида (рис. 14, Г). Так, диаметр ворсинок в группе Уабаин+ЛПС стал практически равен диаметру ворсинок в контрольной группе (98 мкм vs 90 мкм, соответственно). Однако предварительно введенный уабаин перед эндотоксином не оказал влияния на длину ворсинок - она дополнительно снизилась по сравнению с контрольной группой (р < 0.001, однофакторный дисперсионный анализ) (рис. 15, А, Б).



85

Рис 14 Гистологическое строение ткани тощей кишки крысы при действии ЛПС (1 мг/кг) в условиях 4-х дневного введения уабаина (1 мкг/кг) А – контроль, Б – Уабаин, В – ЛПС, Г – Уабаин+ЛПС Окраска гематоксилин-эозином. Шкала - 200 мкм.





*** - р < 0.001 – группа ЛПС по сравнению с контролем; \$ - р < 0.05, \$\$ - р < 0.01, \$\$\$ - р < 0.001 – группа Уабаин+ЛПС по сравнению с ЛПС; &&& - р < 0.001 – группа Уабаин+ЛПС по сравнению с контролем; ### - р < 0.001 – группа Уабаин по сравнению с контролем; n = 50-60. Однофакторный дисперсионный анализ.

Положительный эффект уабаина в полной мере проявился на уровне крипт – применение уабаина увеличивало глубину крипт (на 13 %) и их диаметр по сравнению с группой ЛПС (р < 0.05 и р < 0.001, соответственно, однофакторный дисперсионный анализ) (рис. 15, В, Г).

Гистологическое строение стенки толстой кишки и эпителия в группе Контроль соответствовало общепринятым параметрам – отмечались хорошо идентифицируемые крипты (рис. 16, А). Применение уабаина достоверно увеличивало глубину крипт на 15 % (р < 0.001, однофакторный дисперсионный анализ) (рис. 16 Б, 17 А). Однако диаметр крипт также увеличивался при действии данного гликозида, что не совпадает с его действием на крипты тонкой кишки (р < 0.05, однофакторный дисперсионный анализ) (рис. 17, Б).

Были зарегистрированы отличия в эффектах липополисахарида на строение эпителия толстой кишки по сравнению с тощей кишкой (рис. 16, В). Его применение уменьшало глубину крипт на 16 % (р < 0.001, однофакторный дисперсионный анализ), однако вызывало увеличение их диаметра по сравнению с контролем (р < 0.001, однофакторный дисперсионный анализ) (рис. 17, А, Б).

Предварительно введенный уабаин перед инъекцией эндотоксина приводил к восстановлению гистологического строения и параметров эпителия толстой кишки близким к контрольной группе (рис. 16, Г). Глубина крипт достоверно увеличилась по сравнению с глубиной крипт при действии липополисахарида до 266 мкм и не обнаруживала отличий от значения в контрольной группе, равное 279 мкм (рис. 17, А). Сходные изменения отмечены и для диаметра крипт, который также восстанавливался при использовании уабаина до значений в группе Контроль (40 мкм vs. 40 мкм, соответственно) (рис. 17, Б).



Рис. 16 Гистологическое строение ткани толстой кишки крысы при действии ЛПС (1 мг/кг) в условиях 4-х дневного введения уабаина (1 мкг/кг)

A-контроль, Б
 – Уабаин, В
 – ЛПС, Г
 – Уабаин+ЛПС

Окраска гематоксилин-эозином.

Шкала - 200 мкм.



Рис. 17 Изменение структуры эпителия толстой кишки крысы при действии ЛПС (1 мг/кг) в условиях 4-х дневного введения уабаина (1 мкг/кг)

*** - p < 0.001 – группа ЛПС по сравнению с контролем; \$\$\$ - p < 0.001 – группа Уабаин+ЛПС по сравнению с ЛПС; # - p < 0.05, ### - p < 0.001 – группа Уабаин по сравнению с контролем; n = 50-60. Однофакторный дисперсионный анализ.

4.5 Изменение уровня белков плотных контактов тощей и толстой кишки крысы при действии липополисахарида в условиях 4-х дневного применения уабаина

Для изучения молекулярного состава плотных контактов методом Вестернблот в эпителии тощей и толстой кишки крысы были выбраны следующие белки: клаудин-1, -2, -3, -5, -8, окклюдин и трицеллюлин. Клаудины идентифицировались как белки с молекулярной массой 15–25 кДа, окклюдин и трицеллюлин – 64 кДа (рис. 18, 19, 20, 21).

При анализе результатов Вестерн-блота для отдельных белков плотных контактов была выявлена разница в интенсивности сигналов в исследованных образцах. С помощью метода денситометрии было установлено, что уровень клаудина-2 и -8 в тощей кишке уменьшался при многократном введении уабаина в дозе 1 мкг/кг по сравнению с контролем (n = 4; p < 0.05, тест Краскал-Уоллиса) (рис. 18). Уровень клаудина-1, -5, окклюдина и трицеллюлина при данном типе воздействия достоверно не изменялся (рис. 4-9, 4-10). Через 24 часа после инъекции липополисахарида в тощей кишке достоверно уменьшался уровень клаудина-1 и клаудина-8 (n = 4; p < 0.05, тест Краскал-Уоллиса) (рис. 19). Однако 4-х кратное введение уабаина перед инъекцией эндотоксина в течение 4 дней предотвращало снижение этих белков плотных контактов.

В толстой кишке обнаружено достоверное увеличение уровня клаудина-1 и уменьшение уровня клаудина-2 при 4-х дневном действии уабаина (n = 4; p < 0.05, тест Краскал-Уоллиса). Введение ЛПС достоверно увеличивало уровни порообразующего клаудина-2 в толстой кишке по сравнению с контролем (n = 4; p < 0.05, тест Краскал-Уоллиса). В то же время, 4-х кратное введение уабаина перед липополисахаридом предотвращало данное увеличение (рис. 20). Уровни клаудина-3, -5, -8, окклюдина и трицеллюлина в толстой кишке не имели статистически значимых отличий от контроля при всех типах воздействия (рис. 20, 21).





* - р < 0.05, ** - р < 0.01 – группа ЛПС по сравнению с контролем; \$ - р < 0.05
- группа Уабаин+ЛПС по сравнению с ЛПС; # - р < 0.05 – группа Уабаин по сравнению с контролем; n=4. Тест Краскал-Уоллиса



Рис. 19 Изменение уровня окклюдина и трицеллюлина в тощей кишке крысы при действии ЛПС (1 мг/кг) в условиях 4-х дневного введения уабаина (1 мкг/кг)

* - р < 0.05 – группа ЛПС по сравнению с контролем; \$ - р < 0.05 - группа
 Уабаин+ЛПС по сравнению с ЛПС; n=4. Тест Краскал-Уоллиса.





*** - p < 0.001 – группа ЛПС по сравнению с контролем; \$\$ - p < 0.01 - группа Уабаин+ЛПС по сравнению с ЛПС; # - p < 0.05, ### - p < 0.001 – группа Уабаин по сравнению с контролем; n=4. Тест Краскал-Уоллиса.





ОБСУЖДЕНИЕ

Увеличение количества факторов регуляции является необходимым условием работы функциональных систем. В повышения надежности проведенном исследовании была поставлена задача изучения регулирующего влияния кардиотонического стероида уабаина, который в наномолярных концентрациях рассматривается как гормон (Blaustein, Hamlyn, 2020), на барьерную функцию эпителия кишки. В этом же ряду следует рассматривать и логическое продолжение этой задачи – изучение его возможного протективного действия на функции эпителия случае нарушения свойств последнего при применении в липополисахарида. Кроме этого, были проанализированы 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-ATФаза является не только транспортером ионов, но и важнейшей сигнальной молекулой (Matchkov, Krivoi, 2016). 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-ATФазы. Таким образом, изучение возможного взаимодействия белков плотных контактов и Na,K-ATФазы 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 (Zakrzewski et al., 2013b; Vergauwen, 2015), a также эпителий тощей и толстой кишки крысы, поскольку мозаика клаудинов отличается в эпителии различных сегментов кишечника (Markov et al., 2010).

Впервые полученные 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 снижающих проницаемость эпителия клаудина-1 и -5; в тонкой кишке – уменьшение порообразующего клаудина-2 и образующего канал для ионов натрия клаудина-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. Эти результаты, в сравнении с данными, полученными на других клеточных линиях: в линии клеток почки собаки MDCK II и в клетках Сертоли, подтверждают специфичность изменения уровня клаудина-1 при действии наномолярных концентраций уабаина (Larre et al., 2010; Dietze et al., 2015). Принимая во внимание установленный ранее вклад клаудинов в межклеточную проницаемость (Марков, 2013), можно сделать вывод о том, что основное регулирующее действие уабаина связано с усилением барьерных свойств эпителия кишки.

Этот вывод также подтверждается данными опытов по применению уабаина в условиях липополисахарид-индуцированного повреждения барьерных свойств эпителия на линии клеток IPEC-J2, а также на кишке крысы. Использование липополисахарида является классическим методом инициации нарушения барьерных свойств различных эпителиев, которое сопряжено с нарушением белков плотных контактов, обеспечивающих непроницаемость эпителия, и с последующим увеличением парацеллюлярной проницаемости. В данной работе 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», который был выражен в снижении ТЭС, изменении морфологии эпителия, межклеточной проницаемости флуоресцентного увеличении ДЛЯ макромолекулярного маркера. Молекулярные изменения в плотных контактах полностью соответствовали этому эффекту. В тонкой кишке ЛПС вызывал снижение «уплотняющего» клаудина-1 и клаудина-8, а также трицеллюлина; в толстой кишке – значительное повышение уровня образующего пору для воды клаудина-2.

было показано, Ранее что уабаин предотвращает липополисахаридиндуцированное острое повреждение легких у мышей (Wang et al., 2018). Полученные впервые в ходе комбинированного применения уабаина и ЛПС результаты дают основания считать, что применение уабаина перед ЛПС предотвращает нарушение барьерных свойств и кишечного эпителия. На клетках линии эпителия IPEC-J2 их последовательное применение предотвращает снижение ТЭС до контрольных значений и уменьшение уровня клаудина-1 и -3. 4-х дневное применение уабаина в модели ЛПС-индуцированной дисфункции эпителия кишки крысы влияет на величину тока «короткого замыкания», препятствует изменению основных морфометрических показателей эпителия сегментов кишки, нивелирует увеличение межклеточной проницаемости. В этих условиях также отмечается предотвращение изменения уровня клаудинов и трицеллюлина, вызванное введением ЛПС. Таким образом, в данной работе впервые было показано, что длительное применение наномолярных концентраций уабаина оказывает помимо регулирующего действия также и протективное, обусловленное, в первую очередь, предотвращением изменения уровня белков плотных контактов в условиях ЛПСиндуцированного нарушения барьерных функций кишечного эпителия.

Полученные результаты также позволили проанализировать возможные молекулярные механизмы сопряжения трансэпителиального и парацеллюлярного транспорта, в которые включены клаудины и Na,K-ATФаза. В первую очередь функционального сопряжения подтверждением возможности путей ЭТИХ перемещения ионов и органических соединений через эпителий является изменение уровня белков плотных контактов при применении лиганда Na,K-ATФазы уабаина. Молекулярные механизмы такого функционального сопряжения в настоящее время не исследованы, но был сформулирован ряд гипотез. По современным литературным данным, Na,K-ATФаза рассматривается не только как транспортер ионов, но и как важнейшая сигнальная молекула (Matchkov, Krivoi, 2016). Одна из гипотез того, как уабаин может влиять на функциональное взаимодействие помпы и белков плотных контактов, заключается в активации сигнального пути, зависимом от Src-киназы, и последующей активации других сигнальных каскадов в клетке, что, в конечном итоге, приводит к изменению молекулярного состава белков плотных контактов (Rincon-Heredia et al., 2014; Venugopal, Blanco, 2017). Другая гипотеза предполагает активацию сигнальных путей ввиду дисбаланса соотношения ионов натрия и калия (Klimanova et al., 2017; Orlov et al., 2017). Третья гипотеза заключается в локальном изменении ионов натрия, что вызывает последовательную трансактивацию Na,K-ATФазы соседних клеток, встройку новых молекул помпы в мембрану и последующую активацию сигнальных путей (Ketchem et al., 2016). В наших 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 запуске именно этого сигнального пути, который включен в межмолекулярное взаимодействие белков плотных контактов и Na,K-ATФазы. Изменение различных белков плотных контактов в клеточной линии IPEC-J2, в тощей и толстой кишке при действии уабаина подчеркивает избирательность этого взаимодействия в различных объектах.

Таким образом, анализ полученных результатов свидетельствует о том, что барьерные свойства эпителия кишки регулируются лигандом Na,K-ATФазы уабаином путем активации cSrc-зависимого пути и изменения уровня белков плотных контактов. Применение уабаина предотвращает дисфункцию эпителия кишки при липополисахарид-индуцированном повреждении.

выводы

1. Уабаин регулирует барьерную функцию монослоя клеточной линии IPEC-J2, увеличивая уровень клаудина-1 и -5, а также активацию Src-киназы.

 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-ATФазы уабаина свидетельствует о возможном функциональном взаимодействии этих молекулярных комплексов.

99

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.

- Золотарев В. А. Взаимодействие синтаз оксида азота с циклооксигеназами при регуляции физиологических и патофизиологических процессов и его роль в механизмах адаптивной гастропротекции / В. А. Золотарев, Р. П. Хропычева // Успехи физиологических наук. – 2021. – Т. 52. – № 4. – С. 3-17.
- Кутина А. В. Влияние миметика глюкагоноподобного пептида-1 на экскрецию натрия и воды почками при нормогликемии и гипергликемии / А. В. Кутина, Е. В. Балботкина, Т. А. Каравашкина, Е. И. Шахматова // Физиология человека. – 2019. – Т. 45. – № 6. – С. 116-123.
- Лопатина Е. В. Участие сердечных гликозидов в регуляции роста эксплантатов ткани сетчатки / Е. В. Лопатина, А. В. Карецкий, В. А. Пеннияйнен, Т. В. Виноградова. – Текст : электронный // Бюллетень Экспериментальной Биологии И Медицины. – 2008. – Т. 146. – № 12.
- Марков А. Г. Белки Плотных Контактов Клаудины: Молекулярное Звено Парацеллюлярного Транспорта / А. Г. Марков. – Текст: электронный // Российский Физиологический Журнал Им. И.м. Сеченова. – 2013. – Т. 99. – Белки Плотных Контактов Клаудины. – № 2.
- Alarcón P. The role of gut microbiota in the regulation of the immune response / P. Alarcón, M. González, É. Castro // Revista Medica De Chile. – 2016. – T. 144. – № 7. – C. 910-916.
- Alexandre M. D. Overexpression of claudin-7 decreases the paracellular Clconductance and increases the paracellular Na+ conductance in LLC-PK1 cells / M. D. Alexandre, Q. Lu, Y.-H. Chen // Journal of Cell Science. – 2005. – T. 118. – № Pt 12. – C. 2683-2693.
- Alnabhani Z. Pseudomonas fluorescens alters the intestinal barrier function by modulating IL-1β expression through hematopoietic NOD2 signaling / Z. Alnabhani, N. Montcuquet, K. Biaggini [и др.] // Inflammatory Bowel Diseases. – 2015. – T. 21. – № 3. – C. 543-555.
- Amagai M. Autoantibodies against a novel epithelial cadherin in pemphigus vulgaris, a disease of cell adhesion / M. Amagai, V. Klaus-Kovtun, J. R. Stanley // Cell. 1991. T. 67. № 5. C. 869-877.
- 9. Amasheh S. Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight 100

junctions of epithelial cells / S. Amasheh, N. Meiri, A. H. Gitter [и др.] // Journal of Cell Science. – 2002. – Т. 115. – № Pt 24. – С. 4969-4976.

- Amasheh S. Contribution of claudin-5 to barrier properties in tight junctions of epithelial cells / S. Amasheh, T. Schmidt, M. Mahn [и др.] // Cell and Tissue Research. – 2005. – T. 321. – № 1. – С. 89-96.
- 11. Amasheh S. Na+ absorption defends from paracellular back-leakage by claudin-8 upregulation / S. Amasheh, S. Milatz, S. M. Krug [и др.] // Biochemical and Biophysical Research Communications. 2009. Т. 378. № 1. С. 45-50.
- 12. Amasheh S. Claudins of intestine and nephron a correlation of molecular tight junction structure and barrier function / S. Amasheh, M. Fromm, D. Günzel // Acta Physiologica (Oxford, England). – 2011a. – T. 201. – № 1. – C. 133-140.
- 13. Angelow S. Claudin-8 modulates paracellular permeability to acidic and basic ions in MDCK II cells / S. Angelow, K.-J. Kim, A. S. L. Yu // The Journal of Physiology. 2006. T. 571. № Pt 1. C. 15-26.
- 14. Atisook K. An oligopeptide permeates intestinal tight junctions at glucose-elicited dilatations. Implications for oligopeptide absorption / K. Atisook, J. L. Madara // Gastroenterology. 1991. T. 100. № 3. C. 719-724.
- 15. Bagrov A. Y. Endogenous Cardiotonic Steroids: Physiology, Pharmacology, and Novel Therapeutic Targets / A. Y. Bagrov, J. I. Shapiro, O. V. Fedorova // Pharmacological Reviews. – 2009. – Vol. 61. – Endogenous Cardiotonic Steroids. – № 1. – P. 9-38.
- 16. Balkovetz D. F. Bacterial invasion by a paracellular route: divide and conquer / D. F. Balkovetz, J. Katz // Microbes and Infection. 2003. T. 5. Bacterial invasion by a paracellular route. № 7. C. 613-619.
- 17. Barwe S. P. Novel role for Na,K-ATPase in phosphatidylinositol 3-kinase signaling and suppression of cell motility / S. P. Barwe, G. Anilkumar, S. Y. Moon [и др.] // Molecular Biology of the Cell. – 2005. – Т. 16. – № 3. – С. 1082-1094.
- 18. Basuroy S. Expression of kinase-inactive c-Src delays oxidative stress-induced disassembly and accelerates calcium-mediated reassembly of tight junctions in the Caco-2 cell monolayer / S. Basuroy, P. Sheth, D. Kuppuswamy [и др.] // The Journal of Biological Chemistry. – 2003. – T. 278. – № 14. – C. 11916-11924.
- 19. Basuroy S. MAPK interacts with occludin and mediates EGF-induced prevention

of tight junction disruption by hydrogen peroxide / S. Basuroy, A. Seth, B. Elias [и др.] // The Biochemical Journal. – 2006. – Т. 393. – № Pt 1. – С. 69-77.

- 20. Bauer N. Ouabain-like compound changes rapidly on physical exercise in humans and dogs: effects of beta-blockade and angiotensin-converting enzyme inhibition / N. Bauer, J. Müller-Ehmsen, U. Krämer [и др.] // Hypertension (Dallas, Tex.: 1979). 2005. Т. 45. Ouabain-like compound changes rapidly on physical exercise in humans and dogs. № 5. С. 1024-1028.
- 21. Behrens J. Dissecting tumor cell invasion: epithelial cells acquire invasive properties after the loss of uvomorulin-mediated cell-cell adhesion / J. Behrens, M. M. Mareel, F. M. Van Roy, W. Birchmeier // The Journal of Cell Biology. 1989.
 T. 108. Dissecting tumor cell invasion. № 6. C. 2435-2447.
- 22. Ben-Yosef T. Claudin 14 knockout mice, a model for autosomal recessive deafness DFNB29, are deaf due to cochlear hair cell degeneration / T. Ben-Yosef, I. A. Belyantseva, T. L. Saunders [и др.] // Human Molecular Genetics. 2003. T. 12. № 16. C. 2049-2061.
- 23. Berendes E. Endogenous glycosides in critically ill patients / E. Berendes, P. Cullen, H. Van Aken [и др.] // Critical Care Medicine. – 2003. – Т. 31. – № 5. – С. 1331-1337.
- 24. Berglund J. J. Regulation of human jejunal transmucosal resistance and MLC phosphorylation by Na(+)-glucose cotransport / J. J. Berglund, M. Riegler, Y. Zolotarevsky [и др.] // American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology. 2001. T. 281. № 6. C. G1487-1493.
- 25. Bertani B. Function and Biogenesis of Lipopolysaccharides / B. Bertani, N. Ruiz // EcoSal Plus. – 2018. – T. 8. – № 1.
- 26. Blackman B. Claudin 7 expression and localization in the normal murine mammary gland and murine mammary tumors / B. Blackman, T. Russell, S. K. Nordeen [и др.] // Breast cancer research: BCR. 2005. Т. 7. № 2. С. R248-255.
- 27. Blanco G. Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function / G. Blanco, R. W. Mercer // The American Journal of Physiology. 1998.
 T. 275. Isozymes of the Na-K-ATPase. № 5. C. F633-650.
- 28. Blanco G. Na,K-ATPase subunit heterogeneity as a mechanism for tissue-specific ion regulation / G. Blanco // Seminars in Nephrology. – 2005. – T. 25. – № 5. –

C. 292-303.

- 29. Blanco G. Novel role of ouabain as a cystogenic factor in autosomal dominant polycystic kidney disease / G. Blanco, D. P. Wallace // American Journal of Physiology. Renal Physiology. – 2013. – T. 305. – № 6. – C. F797-812.
- 30. Blaustein M. P. Ouabain, endogenous ouabain and ouabain-like factors: The Na+ pump/ouabain receptor, its linkage to NCX, and its myriad functions / M. P. Blaustein, J. M. Hamlyn // Cell Calcium. – 2020. – T. 86. – Ouabain, endogenous ouabain and ouabain-like factors. – C. 102159.
- 31. Blaustein M. P. The pump, the exchanger, and the holy spirit: origins and 40-year evolution of ideas about the ouabain-Na + pump endocrine system / M. P. Blaustein // American Journal of Physiology-Cell Physiology. 2018. Vol. 314. The pump, the exchanger, and the holy spirit. № 1. P. C3-C26.
- 32. Boehm M. Rapid paracellular transmigration of Campylobacter jejuni across polarized epithelial cells without affecting TER: role of proteolytic-active HtrA cleaving E-cadherin but not fibronectin / M. Boehm, B. Hoy, M. Rohde [и др.] // Gut Pathogens. 2012. T. 4. Rapid paracellular transmigration of Campylobacter jejuni across polarized epithelial cells without affecting TER. № 1. C. 3.
- 33. Borovik T. E. Role of the Barrier Dysfunction of the Intestines in the Development of Alimentary Allergy in Children / T. E. Borovik, S. G. Makarova, G. V. Yatsyk [и др.] // Current Pediatrics. 2013. T. 12. № 2. С. 12-19.
- 34. Bröer S. Amino acid transport across mammalian intestinal and renal epithelia / S.
 Bröer // Physiological Reviews. 2008. T. 88. № 1. C. 249-286.
- 35. Broussard J. A. Desmosome regulation and signaling in disease / J. A. Broussard,
 S. Getsios, K. J. Green // Cell and Tissue Research. 2015. T. 360. № 3. –
 C. 501-512.
- 36. Cai H. Regulation of apical NHE3 trafficking by ouabain-induced activation of the basolateral Na+-K+-ATPase receptor complex / H. Cai, L. Wu, W. Qu [и др.] // American Journal of Physiology. Cell Physiology. 2008. T. 294. № 2. C. C555-563.
- 37. Chang M. Breakdown of mucin as barrier to digestive enzymes in the ischemic rat small intestine / M. Chang, T. Alsaigh, E. B. Kistler, G. W. Schmid-Schönbein //

PloS One. – 2012. – T. 7. – № 6. – C. e40087.

- 38. Chidgey M. Mice lacking desmocollin 1 show epidermal fragility accompanied by barrier defects and abnormal differentiation / M. Chidgey, C. Brakebusch, E. Gustafsson [и др.] // The Journal of Cell Biology. – 2001. – Т. 155. – № 5. – С. 821-832.
- 39. Chuenchor W. Structures of pattern recognition receptors reveal molecular mechanisms of autoinhibition, ligand recognition and oligomerization / W. Chuenchor, T. Jin, G. Ravilious, T. S. Xiao // Current Opinion in Immunology. – 2014. – T. 26. – C. 14-20.
- 40. Claude P. Fracture faces of zonulae occludentes from «tight» and «leaky» epithelia
 / P. Claude, D. A. Goodenough // The Journal of Cell Biology. 1973. T. 58. –
 № 2. C. 390-400.
- 41. Clausen M. J. V. Sodium/Potassium homeostasis in the cell / M. J. V. Clausen, H. Poulsen // Metal Ions in Life Sciences. 2013. T. 12. C. 41-67.
- 42. Clausen M. V. The Structure and Function of the Na,K-ATPase Isoforms in Health and Disease / M. V. Clausen, F. Hilbers, H. Poulsen // Frontiers in Physiology. 2017. T. 8. C. 371.
- 43. Colegio O. R. Claudins create charge-selective channels in the paracellular pathway between epithelial cells / O. R. Colegio, C. M. Van Itallie, H. J. McCrea [и др.] // American Journal of Physiology. Cell Physiology. 2002. Т. 283. № 1. C. C142-147.
- 44. Combined action of Nucleic Acid-Sensing Toll-Like Receptors (TLRs) and TLR11/TLR12 heterodimers imparts resistance to Toxoplasma gondii in mice / W. A. Andrade, M. do C. Souza, E. R. Martinez [и др.] // Cell host & microbe. 2013. T. 13. № 1. C. 42-53.
- 45. Contreras R. G. Relationship between Na(+),K(+)-ATPase and cell attachment / R. G. Contreras, L. Shoshani, C. Flores-Maldonado [и др.] // Journal of Cell Science. 1999. T. 112 (Pt 23). C. 4223-4232.
- 46. Cordenonsi M. Cingulin Contains Globular and Coiled-Coil Domains and Interacts with Zo-1, Zo-2, Zo-3, and Myosin / M. Cordenonsi, F. D'Atri, E. Hammar [и др.] // The Journal of Cell Biology. 1999. Т. 147. № 7. С. 1569-1582.
- 47. Corfield A. P. Mucins in the gastrointestinal tract in health and disease / A. P.

Corfield, D. Carroll, N. Myerscough, C. S. Probert // Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library. – 2001. – T. 6. – C. D1321-1357.

- 48. Coyne C. B. Role of claudin interactions in airway tight junctional permeability / C.
 B. Coyne, T. M. Gambling, R. C. Boucher [и др.] // American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology. 2003. T. 285. № 5. C. L1166-1178.
- 49. Coyne C. B. CAR: a virus receptor within the tight junction / C. B. Coyne, J. M. Bergelson // Advanced Drug Delivery Reviews. 2005. T. 57. CAR. № 6. C. 869-882.
- 50. Cui X. Protein Interaction and Na/K-ATPase-Mediated Signal Transduction / X. Cui, Z. Xie // Molecules (Basel, Switzerland). 2017. T. 22. № 6. C. 990.
- 51. Cummins P. M. Occludin: one protein, many forms / P. M. Cummins // Molecular and Cellular Biology. – 2012. – T. 32. – Occludin. – № 2. – C. 242-250.
- 52. Daugherty B. L. Regulation of heterotypic claudin compatibility / B. L. Daugherty,
 C. Ward, T. Smith [и др.] // The Journal of Biological Chemistry. 2007. T. 282.
 № 41. C. 30005-30013.
- 53. de Moraes V. L. Lack of sensitivity to ouabain in natural killer activity / V. L. de Moraes, B. Olej, L. de la Rocque, V. M. Rumjanek // FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology. 1989. T. 3. № 12. C. 2425-2429.
- 54. de Vasconcelos D. I. B. Anti-inflammatory and Antinociceptive Activity of Ouabain in Mice / D. I. B. de Vasconcelos, J. A. Leite, L. T. Carneiro [и др.] // Mediators of Inflammation. 2011. Т. 2011. С. 912925.
- 55. Devarajan P. Ankyrin binds to two distinct cytoplasmic domains of Na,K-ATPase alpha subunit / P. Devarajan, D. A. Scaramuzzino, J. S. Morrow // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1994. T. 91. № 8. C. 2965-2969.
- 56. Dietze R. Cardiotonic steroid ouabain stimulates expression of blood-testis barrier proteins claudin-1 and -11 and formation of tight junctions in Sertoli cells / R. Dietze, M. Shihan, A. Stammler [et al.] // Molecular and Cellular Endocrinology. 2015a. Vol. 405. P. 1-13.
- 57. Dobretsov M. Neuronal function and alpha3 isoform of the Na/K-ATPase / M.

Dobretsov, J. R. Stimers // Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library. – 2005. – T. 10. – C. 2373-2396.

- 58. Dostanic I. The alpha 1 isoform of Na,K-ATPase regulates cardiac contractility and functionally interacts and co-localizes with the Na/Ca exchanger in heart / I. Dostanic, J. E. J. Schultz, J. N. Lorenz, J. B. Lingrel // The Journal of Biological Chemistry. 2004. T. 279. № 52. C. 54053-54061.
- 59. Dvela-Levitt M. Reduction in maternal circulating ouabain impairs offspring growth and kidney development / M. Dvela-Levitt, H. Cohen-Ben Ami, H. Rosen [и др.] // Journal of the American Society of Nephrology: JASN. 2015. T. 26. № 5. C. 1103-1114.
- 60. Eakin R. M. FURTHER OBSERVATIONS ON THE FINE STRUCTURE OF SOME INVERTEBRATE EYES / R. M. Eakin, J. A. Westfall // Zeitschrift Fur Zellforschung Und Mikroskopische Anatomie (Vienna, Austria: 1948). – 1964. – T. 62. – C. 310-332.
- 61. Ebnet K. Organization of multiprotein complexes at cell-cell junctions / K. Ebnet // Histochemistry and Cell Biology. 2008. T. 130. № 1. C. 1-20.
- 62. Elia P. P. The Role of Innate Immunity Receptors in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease / P. P. Elia, Y. F. M. Tolentino, C. Bernardazzi, H. S. P. de Souza // Mediators of Inflammation. – 2015. – T. 2015. – C. 936193.
- 63. Fagarasan S. Regulation of IgA synthesis at mucosal surfaces / S. Fagarasan, T. Honjo // Current Opinion in Immunology. 2004. T. 16. № 3. C. 277-283.
- 64. Fanning A. S. The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton / A. S. Fanning, B. J. Jameson, L. A. Jesaitis, J. M. Anderson // The Journal of Biological Chemistry. 1998. T. 273. № 45. C. 29745-29753.
- 65. Farquhar M. G. JUNCTIONAL COMPLEXES IN VARIOUS EPITHELIA / M. G. Farquhar, G. E. Palade // Journal of Cell Biology. 1963. T. 17. № 2. C. 375-412.
- 66. Fujita H. Differential expression and subcellular localization of claudin-7, -8, -12, -13, and -15 along the mouse intestine / H. Fujita, H. Chiba, H. Yokozaki [и др.] // The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society. – 2006. – T. 54. – № 8. – C. 933-944.

- 67. Furuse M. Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin / M. Furuse, K. Fujita, T. Hiiragi [и др.] // The Journal of Cell Biology. 1998. T. 141. Claudin-1 and -2. № 7. C. 1539-1550.
- 68. Furuse M. Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice / M. Furuse, M. Hata, K. Furuse [и др.] // The Journal of Cell Biology. 2002. Т. 156. Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier. № 6. С. 1099-1111.
- 69. Furuse M. Conversion of zonulae occludentes from tight to leaky strand type by introducing claudin-2 into Madin-Darby canine kidney I cells / M. Furuse, K. Furuse, H. Sasaki, S. Tsukita // The Journal of Cell Biology. 2001. T. 153. № 2. C. 263-272.
- 70. Furuse M. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions
 / M. Furuse, T. Hirase, M. Itoh [и др.] // The Journal of Cell Biology. 1993. –
 T. 123. Occludin. № 6 Pt 2. C. 1777-1788.
- 71. Furuse M. Overexpression of occludin, a tight junction-associated integral membrane protein, induces the formation of intracellular multilamellar bodies bearing tight junction-like structures / M. Furuse, K. Fujimoto, N. Sato [и др.] // Journal of Cell Science. – 1996. – Т. 109 (Pt 2). – С. 429-435.
- 72. Furuse M. Manner of interaction of heterogeneous claudin species within and between tight junction strands / M. Furuse, H. Sasaki, S. Tsukita // The Journal of Cell Biology. – 1999. – T. 147. – № 4. – C. 891-903.
- 73. Garcia M. A. Cell–Cell Junctions Organize Structural and Signaling Networks / M.
 A. Garcia, W. J. Nelson, N. Chavez // Cold Spring Harbor Perspectives in Biology.
 2018. T. 10. № 4. C. a029181.
- 74. Garrod D. Desmosome structure, composition and function / D. Garrod, M. Chidgey // Biochimica Et Biophysica Acta. 2008. T. 1778. № 3. C. 572-587.
- 75. Geering K. FXYD proteins: new regulators of Na-K-ATPase / K. Geering // American Journal of Physiology. Renal Physiology. – 2006. – T. 290. – FXYD proteins. – № 2. – C. F241-250.
- 76. Geering K. The functional role of beta subunits in oligomeric P-type ATPases / K. Geering // Journal of Bioenergetics and Biomembranes. 2001. T. 33. № 5. –

C. 425-438.

- 77. Getsios S. Coordinated expression of desmoglein 1 and desmocollin 1 regulates intercellular adhesion / S. Getsios, E. V. Amargo, R. L. Dusek [et al.] // Differentiation. 2004. Vol. 72. № 8. P. 419-433.
- 78. González-Mariscal L. Crosstalk of tight junction components with signaling pathways / L. González-Mariscal, R. Tapia, D. Chamorro // Biochimica Et Biophysica Acta. – 2008. – T. 1778. – № 3. – C. 729-756.
- 79. Gow A. Deafness in Claudin 11-null mice reveals the critical contribution of basal cell tight junctions to stria vascularis function / A. Gow, C. Davies, C. M. Southwood [и др.] // The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience. 2004. Т. 24. № 32. С. 7051-7062.
- 80. Griepp E. Participation of plasma membrane proteins in the formation of tight junction by cultured epithelial cells / E. Griepp, W. Dolan, E. Robbins, D. Sabatini // The Journal of Cell Biology. 1983. T. 96. № 3. C. 693-702.
- 81. Guillemot L. Cingulin regulates claudin-2 expression and cell proliferation through the small GTPase RhoA / L. Guillemot, S. Citi // Molecular Biology of the Cell. – 2006. – T. 17. – № 8. – C. 3569-3577.
- 82. Günzel D. Claudin-10 exists in six alternatively spliced isoforms that exhibit distinct localization and function / D. Günzel, M. Stuiver, P. J. Kausalya [и др.] // Journal of Cell Science. – 2009. – Т. 122. – № Pt 10. – C. 1507-1517.
- 83. Günzel D. Claudins and Other Tight Junction Proteins / D. Günzel, M. Fromm. Text : electronic // Comprehensive Physiology / ed. R. Terjung. – Hoboken, NJ, USA : John Wiley & Sons, Inc., 2012. – URL: http://doi.wiley.com/10.1002/cphy.c110045 (date accessed: 11.01.2020).
- 84. Günzel D. Claudins and the modulation of tight junction permeability / D. Günzel,
 A. S. L. Yu // Physiological Reviews. 2013. T. 93. № 2. C. 525-569.
- 85. Haas M. Src-mediated inter-receptor cross-talk between the Na+/K+-ATPase and the epidermal growth factor receptor relays the signal from ouabain to mitogenactivated protein kinases / M. Haas, H. Wang, J. Tian, Z. Xie // The Journal of Biological Chemistry. – 2002. – T. 277. – № 21. – C. 18694-18702.
- 86. Haines R. L. Keratins and disease at a glance / R. L. Haines, E. B. Lane // Journal of Cell Science. 2012. T. 125. № Pt 17. C. 3923-3928.
- 87. Hamlyn J. M. Observations on the nature, biosynthesis, secretion and significance of endogenous ouabain / J. M. Hamlyn, Z. R. Lu, P. Manunta [и др.] // Clinical and Experimental Hypertension (New York, N.Y.: 1993). 1998. Т. 20. № 5-6. C. 523-533.
- 88. Hamlyn J. M. Endogenous cardiotonic steroids in kidney failure: a review and an hypothesis / J. M. Hamlyn, P. Manunta // Advances in Chronic Kidney Disease. 2015. T. 22. Endogenous cardiotonic steroids in kidney failure. № 3. C. 232-244.
- 89. Hashimoto K. Oxidative stress induces gastric epithelial permeability through claudin-3 / K. Hashimoto, T. Oshima, T. Tomita [и др.] // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 2008. – Т. 376. – № 1. – С. 154-157.
- 90. Hashimoto C. The Toll gene of Drosophila, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein / C. Hashimoto, K. L. Hudson, K. V. Anderson // Cell. 1988. T. 52. № 2. C. 269-279.
- 91. Hauck C. Systemic hypertension: the roles of salt, vascular Na+/K+ ATPase and the endogenous glycosides, ouabain and marinobufagenin / C. Hauck, W. H. Frishman // Cardiology in Review. 2012. T. 20. Systemic hypertension. № 3. C. 130-138.
- 92. Hermiston M. L. Forced expression of E-cadherin in the mouse intestinal epithelium slows cell migration and provides evidence for nonautonomous regulation of cell fate in a self-renewing system / M. L. Hermiston, M. H. Wong, J. I. Gordon // Genes & Development. 1996. T. 10. № 8. C. 985-996.
- 93. Hermiston M. L. In vivo analysis of cadherin function in the mouse intestinal epithelium: essential roles in adhesion, maintenance of differentiation, and regulation of programmed cell death / M. L. Hermiston, J. I. Gordon // The Journal of Cell Biology. 1995. T. 129. In vivo analysis of cadherin function in the mouse intestinal epithelium. № 2. C. 489-506.
- 94. Hewitt K. J. The claudin gene family: expression in normal and neoplastic tissues / K. J. Hewitt, R. Agarwal, P. J. Morin // BMC cancer. – 2006. – T. 6. – The claudin gene family. – C. 186.
- 95. Hilkens J. Cell membrane-associated mucins and their adhesion-modulating property / J. Hilkens, M. J. Ligtenberg, H. L. Vos, S. V. Litvinov // Trends in

Biochemical Sciences. – 1992. – T. 17. – № 9. – C. 359-363.

- 96. Hou J. Claudin-16 and claudin-19 interaction is required for their assembly into tight junctions and for renal reabsorption of magnesium / J. Hou, A. Renigunta, A. S. Gomes [и др.] // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2009. Т. 106. № 36. С. 15350-15355.
- 97. Hou J. Claudin-4 forms paracellular chloride channel in the kidney and requires claudin-8 for tight junction localization / J. Hou, A. Renigunta, J. Yang, S. Waldegger // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2010. T. 107. № 42. C. 18010-18015.
- 98. Hou J. Study of claudin function by RNA interference / J. Hou, A. S. Gomes, D. L.
 Paul, D. A. Goodenough // The Journal of Biological Chemistry. 2006. T. 281.
 № 47. C. 36117-36123.
- 99. Humar B. Hereditary diffuse gastric cancer: a manifestation of lost cell polarity / B. Humar, P. Guilford // Cancer Science. – 2009. – T. 100. – Hereditary diffuse gastric cancer. – № 7. – C. 1151-1157.
- Ikari A. Phosphorylation of paracellin-1 at Ser217 by protein kinase A is essential for localization in tight junctions / A. Ikari, S. Matsumoto, H. Harada [и др.] // Journal of Cell Science. 2006. Т. 119. № Pt 9. С. 1781-1789.
- Ikenouchi J. Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells / J. Ikenouchi, M. Furuse, K. Furuse [и др.] // The Journal of Cell Biology. 2005. Т. 171. № 6. С. 939-945.
- Inai T. Claudin-1 contributes to the epithelial barrier function in MDCK cells
 / T. Inai, J. Kobayashi, Y. Shibata // European Journal of Cell Biology. 1999. –
 T. 78. № 12. C. 849-855.
- Iwasaki A. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system /
 A. Iwasaki, R. Medzhitov // Science (New York, N.Y.). 2010. T. 327. № 5963.
 C. 291-295.
- Jeansonne B. Claudin-8 interacts with multi-PDZ domain protein 1 (MUPP1) and reduces paracellular conductance in epithelial cells / B. Jeansonne, Q. Lu, D. A. Goodenough, Y. H. Chen // Cellular and Molecular Biology (Noisy-Le-Grand, France). 2003. T. 49. № 1. C. 13-21.
- 105. Jou T. S. Intestinal inflammation and mucosal barrier function / F. Sánchez

de Medina, I. Romero-Calvo, C. Mascaraque, O. Martínez-Augustin // Inflammatory Bowel Diseases. – 2014. – T. 20. – № 12. – C. 2394-2404.

- Jou T. S. Structural and functional regulation of tight junctions by RhoA and Rac1 small GTPases / T. S. Jou, E. E. Schneeberger, W. J. Nelson // The Journal of Cell Biology. 1998. T. 142. № 1. C. 101-115.
- 107. Kachar B. Evidence for the lipidic nature of tight junction strands / B.
 Kachar, T. S. Reese // Nature. 1982. Vol. 296. № 5856. P. 464-466.
- 108. Kaiser V. Expression of mammalian defensin genes / V. Kaiser, G. Diamond
 // Journal of Leukocyte Biology. 2000. T. 68. № 6. C. 779-784.
- Kapus A. Coupling between apical and paracellular transport processes / A.
 Kapus, K. Szászi // Biochemistry and Cell Biology = Biochimie Et Biologie
 Cellulaire. 2006. T. 84. № 6. C. 870-880.
- 110. Katahira J. Molecular Cloning and Functional Characterization of the Receptor for Clostridium perfringens Enterotoxin / J. Katahira, N. Inoue, Y. Horiguchi [и др.] // Journal of Cell Biology. 1997. Т. 136. № 6. С. 1239-1247.
- 111. Kausalya P. J. Disease-associated mutations affect intracellular traffic and paracellular Mg2+ transport function of Claudin-16 / P. J. Kausalya, S. Amasheh, D. Günzel [и др.] // The Journal of Clinical Investigation. 2006. Т. 116. № 4. С. 878-891.
- 112. Kawasaki T. Toll-like receptor signaling pathways / T. Kawasaki, T. Kawai
 // Frontiers in Immunology. 2014. T. 5. C. 461.
- 113. Kellett G. L. Apical GLUT2: a major pathway of intestinal sugar absorption
 / G. L. Kellett, E. Brot-Laroche // Diabetes. 2005. T. 54. Apical GLUT2. –
 № 10. C. 3056-3062.
- 114. Ketchem C. J. Low dose ouabain stimulates NaK ATPase α1 subunit association with angiotensin II type 1 receptor in renal proximal tubule cells / C. J. Ketchem, C. D. Conner, R. D. Murray [и др.] // Biochimica Et Biophysica Acta. 2016. Т. 1863. № 11. С. 2624-2636.
- 115. Khalaf F. Cardiotonic Steroids and the Sodium Trade Balance: New Insights into Trade-Off Mechanisms Mediated by the Na+/K+-ATPase / F. Khalaf, P. Dube, A. Mohamed [et al.] // International Journal of Molecular Sciences. 2018. –

Vol. 19. – Cardiotonic Steroids and the Sodium Trade Balance. – № 9. – P. 2576.

- 116. Kim Y. S. Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress / Y. S. Kim, S. B. Ho // Current Gastroenterology Reports. 2010. T. 12. Intestinal goblet cells and mucins in health and disease. № 5. C. 319-330.
- 117. Kimura T. E. Calcium-independent desmosomes of keratinocytes are hyperadhesive / T. E. Kimura, A. J. Merritt, D. R. Garrod // The Journal of Investigative Dermatology. – 2007. – T. 127. – № 4. – C. 775-781.
- Klimanova E. A. Time- and dose dependent actions of cardiotonic steroids on transcriptome and intracellular content of Na+ and K+: a comparative analysis / E. A. Klimanova, A. M. Tverskoi, S. V. Koltsova [и др.] // Scientific Reports. 2017. T. 7. Time- and dose dependent actions of cardiotonic steroids on transcriptome and intracellular content of Na+ and K+. C. 45403.
- 119. Koch P. J. Targeted disruption of the pemphigus vulgaris antigen (desmoglein 3) gene in mice causes loss of keratinocyte cell adhesion with a phenotype similar to pemphigus vulgaris / P. J. Koch, M. G. Mahoney, H. Ishikawa [и др.] // The Journal of Cell Biology. – 1997. – Т. 137. – № 5. – С. 1091-1102.
- 120. Kometiani P. Multiple signal transduction pathways link Na+/K+-ATPase to growth-related genes in cardiac myocytes. The roles of Ras and mitogen-activated protein kinases / P. Kometiani, J. Li, L. Gnudi [и др.] // The Journal of Biological Chemistry. 1998. T. 273. № 24. C. 15249-15256.
- 121. Koto T. Hypoxia disrupts the barrier function of neural blood vessels through changes in the expression of claudin-5 in endothelial cells / T. Koto, K. Takubo, S. Ishida [и др.] // The American Journal of Pathology. 2007. T. 170. № 4. С. 1389-1397.
- 122. Kottke M. D. The desmosome: cell science lessons from human diseases / M.
 D. Kottke, E. Delva, A. P. Kowalczyk // Journal of Cell Science. 2006. T. 119.
 The desmosome. № Pt 5. C. 797-806.
- 123. Krause G. Structure and function of claudins / G. Krause, L. Winkler, S. L. Mueller [и др.] // Biochimica Et Biophysica Acta. 2008. Т. 1778. № 3. С. 631-645.
- 124. Kravtsova V.V. Skeletal Muscle Na,K-ATPase as a Target for Circulating

Ouabain / V. V. Kravtsova, E. V. Bouzinova, V. V. Matchkov, I. I. Krivoi // International Journal of Molecular Sciences. $-2020. - T. 21. - N_{\odot} 8. - C. 2875.$

- 125. Krug S. M. Charge-selective claudin channels: Charge-selective claudin channels / S. M. Krug, D. Günzel, M. P. Conrad [et al.] // Annals of the New York Academy of Sciences. 2012. Vol. 1257. Charge-selective claudin channels. № 1. P. 20-28.
- 126. Krug S. M. Tricellulin forms a barrier to macromolecules in tricellular tight junctions without affecting ion permeability / S. M. Krug, S. Amasheh, J. F. Richter [и др.] // Molecular Biology of the Cell. – 2009. – Т. 20. – № 16. – С. 3713-3724.
- Laredo J. Angiotensin II stimulates secretion of endogenous ouabain from bovine adrenocortical cells via angiotensin type 2 receptors / J. Laredo, J. R. Shah, Z. R. Lu [и др.] // Hypertension (Dallas, Tex.: 1979). 1997. T. 29. № 1 Pt 2. C. 401-407.
- Laredo J. Secretion of endogenous ouabain from bovine adrenocortical cells: role of the zona glomerulosa and zona fasciculata / J. Laredo, B. P. Hamilton, J. M. Hamlyn // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 1995. – T. 212. – Secretion of endogenous ouabain from bovine adrenocortical cells. – № 2. – C. 487-493.
- Larre I. Ouabain modulates epithelial cell tight junction / I. Larre, A. Lazaro,
 R. G. Contreras [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2010.
 Vol. 107. № 25. P. 11387-11392.
- Larre I. The emergence of the concept of tight junctions and physiological regulation by ouabain / I. Larre, A. Ponce, M. Franco, M. Cereijido // Seminars in Cell & Developmental Biology. 2014. Vol. 36. P. 149-156.
- Lauw F. N. Of mice and man: TLR11 (finally) finds profilin / F. N. Lauw,
 D. R. Caffrey, D. T. Golenbock // Trends in Immunology. 2005. T. 26. Of mice and man. № 10. C. 509-511.
- Le Moellic C. Aldosterone and tight junctions: modulation of claudin-4 phosphorylation in renal collecting duct cells / C. Le Moellic, S. Boulkroun, D. González-Nunez [и др.] // American Journal of Physiology. Cell Physiology. 2005. T. 289. Aldosterone and tight junctions. № 6. C. C1513-1521.
- 133. Lee K. Interaction of the alpha subunit of Na,K-ATPase with cofilin / K. Lee,

J. Jung, M. Kim, G. Guidotti // The Biochemical Journal. – 2001. – T. 353. – № Pt 2. – C. 377-385.

- Lemaitre B. The dorsoventral regulatory gene cassette spätzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults / B. Lemaitre, E. Nicolas, L. Michaut [и др.] // Cell. 1996. Т. 86. № 6. С. 973-983.
- Lemmers C. CRB3 binds directly to Par6 and regulates the morphogenesis of the tight junctions in mammalian epithelial cells / C. Lemmers, D. Michel, L. Lane-Guermonprez [и др.] // Molecular Biology of the Cell. 2004. Т. 15. № 3. С. 1324-1333.
- Lewis L. K. Endogenous ouabain is not ouabain / L. K. Lewis, T. G. Yandle,
 P. J. Hilton [и др.] // Hypertension (Dallas, Tex.: 1979). 2014. Т. 64. № 4. С. 680-683.
- Li D. Pattern recognition receptors in health and diseases / D. Li, M. Wu //
 Signal Transduction and Targeted Therapy. 2021. Vol. 6. № 1. P. 1-24.
- Li W. Y. Expression of claudin-7 and -8 along the mouse nephron / W. Y. Li, C. L. Huey, A. S. L. Yu // American Journal of Physiology. Renal Physiology. 2004. T. 286. № 6. C. F1063-1071.
- 139. Lichtstein D. Na+, K+-ATPase Signaling and Bipolar Disorder / D. Lichtstein, A. Ilani, H. Rosen [и др.] // International Journal of Molecular Sciences.
 2018. T. 19. № 8. С. 2314.
- 140. Liévin-Le Moal V. The front line of enteric host defense against unwelcome intrusion of harmful microorganisms: mucins, antimicrobial peptides, and microbiota / V. Liévin-Le Moal, A. L. Servin // Clinical Microbiology Reviews. 2006. T. 19. The front line of enteric host defense against unwelcome intrusion of harmful microorganisms. № 2. C. 315-337.
- Linares G. R. Claudin 18 is a novel negative regulator of bone resorption and osteoclast differentiation / G. R. Linares, R. Brommage, D. R. Powell [и др.] // Journal of Bone and Mineral Research. 2012. Т. 27. № 7. С. 1553-1565.
- Loh Y. H. Extensive expansion of the claudin gene family in the teleost fish,
 Fugu rubripes / Y. H. Loh, A. Christoffels, S. Brenner [и др.] // Genome Research.
 2004. T. 14. № 7. С. 1248-1257.
- 143. Lopatina E.V. MODULATION OF THE TRANSDUCER FUNCTION OF

Na+,K+-ATPase: NEW MECHANISM OF HEART REMODELING / E. V. Lopatina, A. V. Kipenko, N. A. Pasatetskaya [et al.]. – Text : electronic. – 2016. – MODULATION OF THE TRANSDUCER FUNCTION OF Na+,K+-ATPase. – URL: https://tspace.library.utoronto.ca/handle/1807/73817 (date accessed: 04.12.2022).

- Lu A. S. L. Claudin-8 expression in Madin-Darby canine kidney cells augments the paracellular barrier to cation permeation / A. S. L. Yu, A. H. Enck, W. I. Lencer, E. E. Schneeberger // The Journal of Biological Chemistry. 2003. T. 278. № 19. C. 17350-17359.
- 145. Lu Y.-C. LPS/TLR4 signal transduction pathway / Y.-C. Lu, W.-C. Yeh, P.
 S. Ohashi // Cytokine. 2008. T. 42. № 2. C. 145-151.
- Luissint A.-C. Guanine nucleotide-binding protein Gαi2: a new partner of claudin-5 that regulates tight junction integrity in human brain endothelial cells / A.-C. Luissint, C. Federici, F. Guillonneau [и др.] // Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism. 2012. T. 32. Guanine nucleotide-binding protein Gαi2. № 5. C. 860-873.
- 147. Lutsenko S. An essential role for the extracellular domain of the Na,K-ATPase beta-subunit in cation occlusion / S. Lutsenko, J. H. Kaplan // Biochemistry.
 1993. T. 32. № 26. C. 6737-6743.
- Ma T. Y. TNF-alpha-induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability requires NF-kappa B activation / T. Y. Ma, G. K. Iwamoto, N. T. Hoa [и др.] // American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology. 2004. T. 286. № 3. C. G367-376.
- Macpherson A. J. The immune geography of IgA induction and function / A.
 J. Macpherson, K. D. McCoy, F.-E. Johansen, P. Brandtzaeg // Mucosal Immunology. 2008. T. 1. № 1. C. 11-22.
- 150. Madara J. L. Structural basis for physiological regulation of paracellular pathways in intestinal epithelia / J. L. Madara, J. R. Pappenheimer // The Journal of Membrane Biology. 1987. T. 100. № 2. C. 149-164.
- Mandell K. J. The JAM family of proteins / K. J. Mandell, C. A. Parkos //
 Advanced Drug Delivery Reviews. 2005. T. 57. № 6. C. 857-867.

- 152. Mann C. L. Glucocorticoid-induced plasma membrane depolarization during thymocyte apoptosis: association with cell shrinkage and degradation of the Na(+)/K(+)-adenosine triphosphatase / C. L. Mann, C. D. Bortner, C. M. Jewell, J. A. Cidlowski // Endocrinology. 2001. T. 142. Glucocorticoid-induced plasma membrane depolarization during thymocyte apoptosis. № 12. C. 5059-5068.
- Manuta P. Endogenous ouabain in cardiovascular function and disease / P.
 Manunta, M. Ferrandi, G. Bianchi, J. M. Hamlyn // Journal of Hypertension. 2009.
 T. 27. № 1. C. 9-18.
- Manuta P. Endogenous ouabain in renal Na(+) handling and related diseases
 / P. Manunta, E. Messaggio, N. Casamassima [и др.] // Biochimica Et Biophysica
 Acta. 2010. Т. 1802. № 12. С. 1214-1218.
- 155. Markov A. G. Comparative analysis of theophylline and cholera toxin in rat colon reveals an induction of sealing tight junction proteins / A. G. Markov, E. L. Falchuk, N. M. Kruglova [и др.] // Pflugers Archiv: European Journal of Physiology. 2014. Т. 466. № 11. С. 2059-2065.
- 156. Markov A. G. Segmental expression of claudin proteins correlates with tight junction barrier properties in rat intestine / A. G. Markov, A. Veshnyakova, M. Fromm [и др.] // Journal of Comparative Physiology. B, Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology. – 2010. – T. 180. – № 4. – C. 591-598.
- 157. Markov A.G. Cholera toxin perturbs the paracellular barrier in the small intestinal epithelium of rats by affecting claudin-2 and tricellulin / A. G. Markov, O. N. Vishnevskaya, L. S. Okorokova [и др.] // Pflugers Archiv: European Journal of Physiology. 2019. Т. 471. № 9. С. 1183-1189.
- Markov A. G. Claudin clusters as determinants of epithelial barrier function: Claudin Clusters as Determinants of Epithelial Barrier Function / A. G. Markov, J. R. Aschenbach, S. Amasheh // IUBMB Life. – 2015. – Vol. 67. – Claudin clusters as determinants of epithelial barrier function. – № 1. – P. 29-35.
- 159. Masugi F. Normalization of high plasma level of ouabain-like immunoreactivity in primary aldosteronism after removal of adenoma / F. Masugi, T. Ogihara, T. Hasegawa [и др.] // Journal of Human Hypertension. 1988. T. 2. № 1. С. 17-20.
- 160. Matchkov V. V. Specialized Functional Diversity and Interactions of the

Na,K-ATPase / V. V. Matchkov, I. I. Krivoi // Frontiers in Physiology. – 2016. – T. 7. – C. 179.

- 161. Matsumori A. Modulation of cytokine production and protection against lethal endotoxemia by the cardiac glycoside ouabain / A. Matsumori, K. Ono, R. Nishio [и др.] // Circulation. 1997. Т. 96. № 5. С. 1501-1506.
- 162. McDole J. R. Goblet cells deliver luminal antigen to CD103+ dendritic cells in the small intestine / J. R. McDole, L. W. Wheeler, K. G. McDonald [и др.] // Nature. – 2012. – T. 483. – № 7389. – С. 345-349.
- 163. Medzhitov R. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity / R. Medzhitov, P. Preston-Hurlburt, C. A. Janeway // Nature. – 1997. – T. 388. – № 6640. – C. 394-397.
- Mercer D. W. Effects of Lipopolysaccharide on Intestinal Injury: Potential Role of Nitric Oxide and Lipid Peroxidation / D. W. Mercer, G. S. Smith, J. M. Cross [и др.] // Journal of Surgical Research. 1996. Т. 63. Effects of Lipopolysaccharide on Intestinal Injury. № 1. С. 185-192.
- Merritt A. J. Suprabasal desmoglein 3 expression in the epidermis of transgenic mice results in hyperproliferation and abnormal differentiation / A. J. Merritt, M. Y. Berika, W. Zhai [и др.] // Molecular and Cellular Biology. 2002. Т. 22. № 16. С. 5846-5858.
- 166. Meyer T. N. Galpha12 regulates epithelial cell junctions through Src tyrosine kinases / T. N. Meyer, J. Hunt, C. Schwesinger, B. M. Denker // American Journal of Physiology. Cell Physiology. – 2003. – T. 285. – № 5. – C. C1281-1293.
- 167. Mineta K. Predicted expansion of the claudin multigene family / K. Mineta,
 Y. Yamamoto, Y. Yamazaki [и др.] // FEBS letters. 2011. T. 585. № 4. –
 C. 606-612.
- Mitchell L. A. Differential effects of claudin-3 and claudin-4 on alveolar epithelial barrier function / L. A. Mitchell, C. E. Overgaard, C. Ward [и др.] // American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology. 2011. T. 301. № 1. C. L40-49.
- 169. Miyamoto T. Tight junctions in Schwann cells of peripheral myelinated axons: a lesson from claudin-19-deficient mice / T. Miyamoto, K. Morita, D. Takemoto [и др.] // The Journal of Cell Biology. 2005. T. 169. Tight junctions

in Schwann cells of peripheral myelinated axons. $-N_{2} 3. - C. 527-538.$

- 170. Mohammad S. Role of Metabolic Endotoxemia in Systemic Inflammation and Potential Interventions / S. Mohammad, C. Thiemermann // Frontiers in Immunology. – 2021. – T. 11. – C. 594150.
- Molenda M. Paracellular Transport through Healthy and Cystic Fibrosis Bronchial Epithelial Cell Lines – Do We Have a Proper Model? / N. Molenda, K. Urbanova, N. Weiser [и др.] // PLoS ONE. – 2014. – Т. 9. – № 6. – С. e100621.
- Morth Crystal J. P. structure of the sodium-potassium pump / J. P. Morth, B.
 P. Pedersen, M. S. Toustrup-Jensen [и др.] // Nature. 2007. Т. 450. № 7172. С. 1043-1049.
- 173. Nakagawa Y. A role for the Na/K-ATPase in the control of human c-fos and c-jun transcription / Y. Nakagawa, V. Rivera, A. C. Larner // The Journal of Biological Chemistry. 1992. T. 267. № 13. C. 8785-8788.
- 174. Nassir F. CD36 is important for fatty acid and cholesterol uptake by the proximal but not distal intestine / F. Nassir, B. Wilson, X. Han [и др.] // The Journal of Biological Chemistry. 2007. T. 282. № 27. C. 19493-19501.
- 175. Nekrasova O. Desmosome assembly and dynamics / O. Nekrasova, K. J. Green // Trends in Cell Biology. 2013. T. 23. № 11. C. 537-546.
- 176. Nelson W. J. Ankyrin binding to (Na+ + K+)ATPase and implications for the organization of membrane domains in polarized cells / W. J. Nelson, P. J. Veshnock // Nature. 1987. T. 328. № 6130. C. 533-536.
- 177. Nicaise P. The intestinal microflora regulates cytokine production positively in spleen-derived macrophages but negatively in bone marrow-derived macrophages / P. Nicaise, A. Gleizes, C. Sandre [и др.] // European Cytokine Network. – 1999. – T. 10. – № 3. – C. 365-372.
- 178. Nitta T. Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice / T. Nitta, M. Hata, S. Gotoh [и др.] // The Journal of Cell Biology. 2003. T. 161. № 3. С. 653-660.
- Núñez Miguel R. A Dimer of the Toll-Like Receptor 4 Cytoplasmic Domain Provides a Specific Scaffold for the Recruitment of Signalling Adaptor Proteins / R. Núñez Miguel, J. Wong, J. F. Westoll [и др.] // PLoS ONE. – 2007. – Т. 2. – № 8. – С. e788.

- 180. Ogimoto G. G protein-coupled receptors regulate Na+,K+-ATPase activity and endocytosis by modulating the recruitment of adaptor protein 2 and clathrin / G. Ogimoto, G. A. Yudowski, C. J. Barker [и др.] // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2000. T. 97. № 7. C. 3242-3247.
- 181. Oh S.-J. Aging and the Immune System: the Impact of Immunosenescence on Viral Infection, Immunity and Vaccine Immunogenicity / S.-J. Oh, J. K. Lee, O. S. Shin // Immune Network. 2019. T. 19. Aging and the Immune System. № 6. C. e37.
- 182. Orlov S. Na+i,K+i-Dependent and -Independent Signaling Triggered by Cardiotonic Steroids: Facts and Artifacts / S. Orlov, E. Klimanova, A. Tverskoi [et al.] // Molecules. – 2017. – Vol. 22. – Na+i,K+i-Dependent and -Independent Signaling Triggered by Cardiotonic Steroids. – № 4. – P. 635.
- 183. Oweis S. Cardiac glycoside downregulates NHE3 activity and expression in LLC-PK1 cells / S. Oweis, L. Wu, P. R. Kiela [и др.] // American Journal of Physiology. Renal Physiology. – 2006. – Т. 290. – № 5. – С. F997-1008.
- 184. Pácha J. Development of intestinal transport function in mammals / J. Pácha
 // Physiological Reviews. 2000. T. 80. № 4. C. 1633-1667.
- 185. Page M. J. The Role of Lipopolysaccharide-Induced Cell Signalling in Chronic Inflammation / M. J. Page, D. B. Kell, E. Pretorius // Chronic Stress. – 2022. – T. 6. – C. 24705470221076390.
- 186. Pappenheimer J. R. On the coupling of membrane digestion with intestinal absorption of sugars and amino acids / J. R. Pappenheimer // The American Journal of Physiology. – 1993. – T. 265. – № 3 Pt 1. – C. G409-417.
- 187. Park B. S. Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes /
 B. S. Park, J.-O. Lee // Experimental & Molecular Medicine. 2013. T. 45. –
 C. e66.
- 188. Peng S. Claudin-19 and the barrier properties of the human retinal pigment epithelium / S. Peng, V. S. Rao, R. A. Adelman, L. J. Rizzolo // Investigative Ophthalmology & Visual Science. – 2011. – T. 52. – № 3. – C. 1392-1403.
- 189. Pierre S. V. The Na,K-ATPase receptor complex: its organization and membership / S. V. Pierre, Z. Xie // Cell Biochemistry and Biophysics. – 2006. –

T. 46. – The Na,K-ATPase receptor complex. – N_{2} 3. – C. 303-316.

- Piontek J. Elucidating the principles of the molecular organization of heteropolymeric tight junction strands / J. Piontek, S. Fritzsche, J. Cording [и др.]
 // Cellular and molecular life sciences: CMLS. 2011. Т. 68. № 23. С. 3903-3918.
- 191. Pires V. Ouabain effects on activated lymphocytes: augmentation of CD25 expression on TPA-stimulated cells and of CD69 on PHA-and TPA-stimulated cells
 / V. Pires, R. C. Harab, B. Olej, V. M. Rumjanek // International Journal of Immunopharmacology. 1997. T. 19. Ouabain effects on activated lymphocytes. № 3. C. 143-148.
- 192. Protze J. Directed structural modification of Clostridium perfringens enterotoxin to enhance binding to claudin-5 / J. Protze, M. Eichner, A. Piontek [и др.] // Cellular and molecular life sciences: CMLS. – 2015. – Т. 72. – № 7. – C. 1417-1432.
- 193. Pushpanathan P. Gut microbiota and its mysteries / P. Pushpanathan, G. S. Mathew, S. Selvarajan [и др.] // Indian Journal of Medical Microbiology. 2019. Т. 37. № 2. С. 268-277.
- 194. Rajamanickam G. D. The ubiquitous isoform of Na/K-ATPase (ATP1A1) regulates junctional proteins, connexin 43 and claudin 11 via Src-EGFR-ERK1/2-CREB pathway in rat Sertoli cells[†] / G. D. Rajamanickam, J. P. Kastelic, J. C. Thundathil // Biology of Reproduction. 2017a. Vol. 96. № 2. P. 456-468.
- 195. Rajasekaran S. A. Na,K-ATPase beta-subunit is required for epithelial polarization, suppression of invasion, and cell motility / S. A. Rajasekaran, L. G. Palmer, K. Quan [и др.] // Molecular Biology of the Cell. 2001. T. 12. № 2. C. 279-295.
- Rajasekaran S. A. Na,K-ATPase inhibition alters tight junction structure and permeability in human retinal pigment epithelial cells / S. A. Rajasekaran, J. Hu, J. Gopal [и др.] // American Journal of Physiology. Cell Physiology. 2003. T. 284. № 6. C. C1497-1507.
- 197. Rajasekaran S. A. Na-K-ATPase regulates tight junction permeability through occludin phosphorylation in pancreatic epithelial cells / S. A. Rajasekaran, S. P. Barwe, J. Gopal [и др.] // American Journal of Physiology. Gastrointestinal

and Liver Physiology. – 2007. – T. 292. – № 1. – C. G124-133.

- 198. Rajasekaran S. A. Interactions of tight junctions with membrane channels and transporters / S. A. Rajasekaran, K. W. Beyenbach, A. K. Rajasekaran // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Biomembranes. 2008. Vol. 1778. № 3. P. 757-769.
- 199. Rajasekaran S. A. Na,K-ATPase and epithelial tight junctions / S. A. Rajasekaran, A. K. Rajasekaran // Frontiers in Bioscience (Landmark Edition). 2009. T. 14. № 6. C. 2130-2148.
- 200. Raleigh D. R. Tight junction-associated MARVEL proteins marveld3, tricellulin, and occludin have distinct but overlapping functions / D. R. Raleigh, A. M. Marchiando, Y. Zhang [и др.] // Molecular Biology of the Cell. 2010. T. 21. № 7. C. 1200-1213.
- 201. Rhee S. H. Lipopolysaccharide: basic biochemistry, intracellular signaling, and physiological impacts in the gut / S. H. Rhee // Intestinal Research. 2014. T. 12. Lipopolysaccharide. № 2. C. 90-95.
- 202. Riazuddin S. Tricellulin is a tight-junction protein necessary for hearing / S. Riazuddin, Z. M. Ahmed, A. S. Fanning [и др.] // American Journal of Human Genetics. 2006. Т. 79. № 6. С. 1040-1051.
- 203. Ribeiro A. B. Dexamethasone Prevents Lipopolysaccharide-Induced Epithelial Barrier Dysfunction in Rat Ileum / A. B. Ribeiro, H. Giusti, A. P. T. Souza [и др.] // Shock (Augusta, Ga.). 2018. Т. 49. № 3. С. 334-344.
- 204. Rincon-Heredia R. Ouabain induces endocytosis and degradation of tight junction proteins through ERK1/2-dependent pathways / R. Rincon-Heredia, D. Flores-Benitez, C. Flores-Maldonado [et al.] // Experimental Cell Research. 2014. Vol. 320. № 1. P. 108-118.
- 205. Rizzolo L. J. Barrier properties of cultured retinal pigment epithelium / L. J.
 Rizzolo // Experimental Eye Research. 2014. T. 126. C. 16-26.
- 206. Rodrigues-Mascarenhas S. Modulation of the immune system by ouabain / S. Rodrigues-Mascarenhas, A. Da Silva de Oliveira, N. D. Amoedo [и др.] // Annals of the New York Academy of Sciences. 2009. Т. 1153. С. 153-163.
- 207. Rodrigues-Mascarenhas S. Synergistic effect between ouabain and glucocorticoids for the induction of thymic atrophy / S. Rodrigues-Mascarenhas, N.

F. dos Santos, V. M. Rumjanek // Bioscience Reports. – 2006. – T. 26. – № 2. –
C. 159-169.

- 208. Rosental R. Water channels and barriers formed by claudins: Claudins and water transport / R. Rosenthal, D. Günzel, D. Theune [et al.] // Annals of the New York Academy of Sciences. 2017. Vol. 1397. Water channels and barriers formed by claudins. № 1. P. 100-109.
- 209. Rossi G. Immunoreactive endogenous ouabain in primary aldosteronism and essential hypertension: relationship with plasma renin, aldosterone and blood pressure levels / G. Rossi, P. Manunta, J. M. Hamlyn [и др.] // Journal of Hypertension. 1995. T. 13. Immunoreactive endogenous ouabain in primary aldosteronism and essential hypertension. № 10. C. 1181-1191.
- Russ P. K. Bves modulates tight junction associated signaling / P. K. Russ,
 C. J. Pino, C. S. Williams [и др.] // PloS One. 2011. Т. 6. № 1. С. e14563.
- Sabath E. Galpha12 regulates protein interactions within the MDCK cell tight junction and inhibits tight-junction assembly / E. Sabath, H. Negoro, S. Beaudry [и др.] // Journal of Cell Science. 2008. Т. 121. № Pt 6. С. 814-824.
- Saez J. C. Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions / J. C. Saez, V. M. Berthoud, M. C. Branes [и др.] // Physiological Reviews. 2003. Т. 83. Plasma membrane channels formed by connexins. № 4. C. 1359-1400.
- 213. Saitou M. Occludin-deficient Embryonic Stem Cells Can Differentiate into Polarized Epithelial Cells Bearing Tight Junctions / M. Saitou, K. Fujimoto, Y. Doi [и др.] // The Journal of Cell Biology. 1998. Т. 141. № 2. С. 397-408.
- 214. Sánchez-Pulido L. MARVEL: a conserved domain involved in membrane apposition events / L. Sánchez-Pulido, F. Martín-Belmonte, A. Valencia, M. A. Alonso // Trends in Biochemical Sciences. 2002. T. 27. MARVEL. № 12. C. 599-601.
- 215. Scalise A. A. The blood-brain and gut-vascular barriers: from the perspective of claudins / A. A. Scalise, N. Kakogiannos, F. Zanardi [и др.] // Tissue Barriers. 2021. T. 9. The blood-brain and gut-vascular barriers. № 3. C. 1926190.
- 216. Schneider D. S. A processed form of the Spätzle protein defines dorsal-

ventral polarity in the Drosophila embryo / D. S. Schneider, Y. Jin, D. Morisato, K. V. Anderson // Development (Cambridge, England). – 1994. – T. 120. – № 5. – C. 1243-1250.

- 217. Schoner W. Endogenous and exogenous cardiac glycosides and their mechanisms of action / W. Schoner, G. Scheiner-Bobis // American Journal of Cardiovascular Drugs: Drugs, Devices, and Other Interventions. 2007. T. 7. № 3. C. 173-189.
- 218. Schoner W. Endogenous cardiac glycosides: hormones using the sodium pump as signal transducer / W. Schoner, G. Scheiner-Bobis // Seminars in Nephrology. – 2005. – T. 25. – Endogenous cardiac glycosides. – № 5. – C. 343-351.
- 219. Schultz S. G. Coupled transport of sodium and organic solutes / S. G. Schultz,
 P. F. Curran // Physiological Reviews. 1970. T. 50. № 4. C. 637-718.
- Schultz S. G. Electrical potential differences and electromotive forces in epithelial tissues / S. G. Schultz // The Journal of General Physiology. 1972. T. 59. № 6. C. 794-798.
- 221. Severson E. A. Mechanisms of outside-in signaling at the tight junction by junctional adhesion molecule A / E. A. Severson, C. A. Parkos // Annals of the New York Academy of Sciences. 2009. T. 1165. C. 10-18.
- 222. Shen L. Tight junction pore and leak pathways: a dynamic duo / L. Shen, C.
 R. Weber, D. R. Raleigh [и др.] // Annual Review of Physiology. 2011. Т. 73.
 Tight junction pore and leak pathways. С. 283-309.
- 223. Shoshani L. The polarized expression of Na+,K+-ATPase in epithelia depends on the association between beta-subunits located in neighboring cells / L. Shoshani, R. G. Contreras, M. L. Roldán [и др.] // Molecular Biology of the Cell. 2005. Т. 16. № 3. С. 1071-1081.
- Shull G. E. Amino-acid sequence of the beta-subunit of the (Na+ + K+)ATPase deduced from a cDNA / G. E. Shull, L. K. Lane, J. B. Lingrel // Nature.
 1986. T. 321. № 6068. C. 429-431.
- 225. Siliciano J. D. Localization of the tight junction protein, ZO-1, is modulated by extracellular calcium and cell-cell contact in Madin-Darby canine kidney epithelial cells / J. D. Siliciano, D. A. Goodenough // The Journal of Cell Biology.

- 1988. - T. 107. - № 6 Pt 1. - C. 2389-2399.

- 226. Simon D. B. Paracellin-1, a renal tight junction protein required for paracellular Mg2+ resorption / D. B. Simon, Y. Lu, K. A. Choate [и др.] // Science (New York, N.Y.). – 1999. – Т. 285. – № 5424. – С. 103-106.
- 227. Steed E. Identification of MarvelD3 as a tight junction-associated transmembrane protein of the occludin family / E. Steed, N. T. L. Rodrigues, M. S. Balda, K. Matter // BMC cell biology. 2009. T. 10. C. 95.
- Stella P. Endogenous ouabain and cardiomyopathy in dialysis patients / P.
 Stella, P. Manunta, F. Mallamaci [и др.] // Journal of internal medicine. 2008. T. 263. № 3. С. 274-280.
- 229. Stevenson B. R. Zonulae occludentes in junctional complex-enriched fractions from mouse liver: preliminary morphological and biochemical characterization / B. R. Stevenson, D. A. Goodenough // The Journal of Cell Biology. 1984. T. 98. Zonulae occludentes in junctional complex-enriched fractions from mouse liver. № 4. C. 1209-1221.
- 230. Stiffler M. A. PDZ domain binding selectivity is optimized across the mouse proteome / M. A. Stiffler, J. R. Chen, V. P. Grantcharova [и др.] // Science (New York, N.Y.). – 2007. – Т. 317. – № 5836. – С. 364-369.
- 231. Suzuki K. GALT: organization and dynamics leading to IgA synthesis / K.
 Suzuki, S. Kawamoto, M. Maruya, S. Fagarasan // Advances in Immunology. –
 2010. T. 107. GALT. C. 153-185.
- 232. Szamel M. Functional interrelationship between (Na+ + K+)-ATPase and lysolecithin acyltransferase in plasma membranes of mitogen-stimulated rabbit thymocytes / M. Szamel, S. Schneider, K. Resch // The Journal of Biological Chemistry. – 1981. – T. 256. – № 17. – C. 9198-9204.
- 233. Takaishi K. Regulation of cell-cell adhesion by rac and rho small G proteins in MDCK cells / K. Takaishi, T. Sasaki, H. Kotani [и др.] // The Journal of Cell Biology. 1997. Т. 139. № 4. С. 1047-1059.
- 234. Takeichi M. Dynamic contacts: rearranging adherens junctions to drive epithelial remodelling / M. Takeichi // Nature Reviews. Molecular Cell Biology. 2014. T. 15. Dynamic contacts. № 6. C. 397-410.
- 235. Tamura A. Loss of claudin-15, but not claudin-2, causes Na+ deficiency and

glucose malabsorption in mouse small intestine / A. Tamura, H. Hayashi, M. Imasato [и др.] // Gastroenterology. – 2011. – Т. 140. – № 3. – С. 913-923.

- 236. Tamura A. Megaintestine in claudin-15-deficient mice / A. Tamura, Y. Kitano, M. Hata [и др.] // Gastroenterology. 2008. Т. 134. № 2. С. 523-534.
- 237. Tariq H. Cadherin flexibility provides a key difference between desmosomes and adherens junctions / H. Tariq, J. Bella, T. A. Jowitt [и др.] // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2015. – T. 112. – № 17. – C. 5395-5400.
- 238. Tariq H. Cardiac glycosides inhibit TNF-α/NF-κB signaling by blocking recruitment of TNF receptor-associated death domain to the TNF receptor / Q. Yang, W. Huang, C. Jozwik [и др.] // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2005. – T. 102. – № 27. – C. 9631-9636.
- 239. Temperley N. D. Evolution of the chicken Toll-like receptor gene family: a story of gene gain and gene loss / N. D. Temperley, S. Berlin, I. R. Paton [и др.] // BMC genomics. 2008. Т. 9. Evolution of the chicken Toll-like receptor gene family. С. 62.
- 240. Tian J. Binding of Src to Na+/K+-ATPase forms a functional signaling complex / J. Tian, T. Cai, Z. Yuan [и др.] // Molecular Biology of the Cell. 2006.
 T. 17. № 1. C. 317-326.
- 241. Tokumasu R. Time- and dose-dependent claudin contribution to biological functions: Lessons from claudin-1 in skin / R. Tokumasu, A. Tamura, S. Tsukita // Tissue Barriers. 2017. T. 5. Time- and dose-dependent claudin contribution to biological functions. № 3. C. e1336194.
- 242. Tsukita S. The Claudins: From Tight Junctions to Biological Systems / S. Tsukita, H. Tanaka, A. Tamura // Trends in Biochemical Sciences. 2019. T. 44. The Claudins. № 2. C. 141-152.
- 243. Turner J. R. Physiological regulation of epithelial tight junctions is associated with myosin light-chain phosphorylation / J. R. Turner, B. K. Rill, S. L. Carlson [и др.] // The American Journal of Physiology. – 1997. – Т. 273. – № 4. – С. С1378-1385.
- 244. Turner J. R. Transepithelial resistance can be regulated by the intestinal

brush-border Na(+)/H(+) exchanger NHE3 / J. R. Turner, E. D. Black, J. Ward [μ др.] // American Journal of Physiology. Cell Physiology. – 2000. – T. 279. – N_{2} 6. – C. C1918-1924.

- 245. Turner J. R. Show me the pathway! Regulation of paracellular permeability by Na(+)-glucose cotransport / J. R. Turner // Advanced Drug Delivery Reviews. 2000. T. 41. № 3. C. 265-281.
- 246. Vagin O. The role of the beta1 subunit of the Na,K-ATPase and its glycosylation in cell-cell adhesion / O. Vagin, E. Tokhtaeva, G. Sachs // The Journal of Biological Chemistry. 2006. T. 281. № 51. C. 39573-39587.
- 247. Valente R. C. mCD14 expression in human monocytes is downregulated by ouabain via transactivation of epithelial growth factor receptor and activation of p38 mitogen-activated protein kinase / R. C. Valente, C. R. Nascimento, E. G. Araujo, V. M. Rumjanek // Neuroimmunomodulation. 2009. T. 16. № 4. C. 228-236.
- Van Itallie C. M. Occludin is required for cytokine-induced regulation of tight junction barriers / C. M. Van Itallie, A. S. Fanning, J. Holmes, J. M. Anderson // Journal of Cell Science. 2010. T. 123. № Pt 16. C. 2844-2852.
- 249. Van Itallie C. M. Claudins and epithelial paracellular transport / C. M. Van Itallie, J. M. Anderson // Annual Review of Physiology. 2006. T. 68. C. 403-429.
- 250. Van Itallie C. M. Reversal of charge selectivity in cation or anion-selective epithelial lines by expression of different claudins / C. M. Van Itallie, A. S. Fanning, J. M. Anderson // American Journal of Physiology. Renal Physiology. 2003. T. 285. № 6. C. F1078-1084.
- 251. Van Itallie C. Regulated expression of claudin-4 decreases paracellular conductance through a selective decrease in sodium permeability / C. Van Itallie, C. Rahner, J. M. Anderson // The Journal of Clinical Investigation. 2001. T. 107. № 10. C. 1319-1327.
- 252. Venugopal J. On the Many Actions of Ouabain: Pro-Cystogenic Effects in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease / J. Venugopal, G. Blanco // Molecules (Basel, Switzerland). 2017. T. 22. On the Many Actions of Ouabain. № 5. C. 729.
- 253. Vergauwen H. The IPEC-J2 Cell Line / H. Vergauwen. Text : electronic //

The Impact of Food Bioactives on Health / eds. K. Verhoeckx [et al.]. – Cham : Springer International Publishing, 2015. – P. 125-134. – URL: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-16104-4_12 (date accessed: 11.01.2020).

- 254. Vetrano S. The role of JAM-A in inflammatory bowel disease: unrevealing the ties that bind / S. Vetrano, S. Danese // Annals of the New York Academy of Sciences. 2009. T. 1165. The role of JAM-A in inflammatory bowel disease. C. 308-313.
- 255. Vidya M. K. Toll-like receptors: Significance, ligands, signaling pathways, and functions in mammals / M. K. Vidya, V. G. Kumar, V. Sejian [и др.] // International Reviews of Immunology. 2018. Т. 37. Toll-like receptors. № 1. С. 20-36.
- Wang C. Ouabain Protects Mice Against Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung Injury / C. Wang, Y. Meng, Y. Wang [и др.] // Medical Science Monitor : International Medical Journal of Experimental and Clinical Research. 2018. T. 24. C. 4455-4464.
- 257. Wang H. Ouabain assembles signaling cascades through the caveolar Na+/K+-ATPase / H. Wang, M. Haas, M. Liang [и др.] // The Journal of Biological Chemistry. 2004. T. 279. № 17. С. 17250-17259.
- 258. Wessells H. Transcriptional profiling of human cavernosal endothelial cells reveals distinctive cell adhesion phenotype and role for claudin 11 in vascular barrier function / H. Wessells, C. J. Sullivan, Y. Tsubota [и др.] // Physiological Genomics. – 2009. – T. 39. – № 2. – C. 100-108.
- 259. Wright E. M. The sodium/glucose cotransport family SLC5 / E. M. Wright,
 E. Turk // Pflugers Archiv: European Journal of Physiology. 2004. T. 447. № 5. C. 510-518.
- Wu Z. Distinct effects of Vibrio cholerae haemagglutinin/protease on the structure and localization of the tight junction-associated proteins occludin and ZO-1 / Z. Wu, P. Nybom, K. E. Magnusson // Cellular Microbiology. 2000. T. 2. № 1. C. 11-17.
- 261. Xie Z. Na(+)/K(+)-ATPase as a signal transducer / Z. Xie, A. Askari // European Journal of Biochemistry. 2002. T. 269. № 10. C. 2434-2439.

- 262. Xie Z. Na+-K+--ATPase-mediated signal transduction: from protein interaction to cellular function / Z. Xie, T. Cai // Molecular Interventions. 2003. T. 3. Na+-K+--ATPase-mediated signal transduction. № 3. C. 157-168.
- 263. Yamamoto M. Current views of toll-like receptor signaling pathways / M.
 Yamamoto, K. Takeda // Gastroenterology Research and Practice. 2010. T. 2010. C. 240365.
- Yan H. Butyrate modifies intestinal barrier function in IPEC-J2 cells through a selective upregulation of tight junction proteins and activation of the Akt signaling pathway / H. Yan, K. M. Ajuwon // PLOS ONE. 2017. Vol. 12. № 6. P. e0179586.
- 265. Ye D. Molecular mechanism of tumor necrosis factor-alpha modulation of intestinal epithelial tight junction barrier / D. Ye, I. Ma, T. Y. Ma // American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology. – 2006. – T. 290. – № 3. – C. G496-504.
- 266. Yuan Z. Na/K-ATPase tethers phospholipase C and IP3 receptor into a calcium-regulatory complex / Z. Yuan, T. Cai, J. Tian [и др.] // Molecular Biology of the Cell. 2005. T. 16. № 9. C. 4034-4045.
- Zahraoui A. Tight Junction, a Platform for Trafficking and Signaling Protein Complexes / A. Zahraoui, D. Louvard, T. Galli // The Journal of Cell Biology. 2000. T. 151. № 5. C. 31-36.
- 268. Zakrzewski S. S. Improved Cell Line IPEC-J2, Characterized as a Model for Porcine Jejunal Epithelium / S. S. Zakrzewski, J. F. Richter, S. M. Krug [и др.] // PLoS ONE. – 2013a. – Т. 8. – № 11. – С. e79643.
- Zakrzewski S. S. Improved cell line IPEC-J2, characterized as a model for porcine jejunal epithelium / S. S. Zakrzewski, J. F. Richter, S. M. Krug [и др.] // PloS One. 2013b. Т. 8. № 11. С. e79643.
- Zeissig S. Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease / S. Zeissig, N. Bürgel, D. Günzel [и др.] // Gut. 2007. Т. 56. № 1. С. 61-72.