На правах рукописи

Ливанова Александра Андреевна

БАРЬЕРНЫЕ СВОЙСТВА ТОЩЕЙ И ТОЛСТОЙ КИШКИ КРЫСЫ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ: РОЛЬ БЕЛКОВ ПЛОТНЫХ КОНТАКТОВ

1.5.5. – физиология человека и животных

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург
2023

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

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

Официальные оппоненты: **Антонов Сергей Михайлович** - доктор биологических наук, заведующий лабораторией сравнительной нейрофизиологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург

Зацепин Виктор Викторович - кандидат медицинских наук, доцент кафедры военной токсикологии и медицинской защиты Федерального государственного бюджетного военного образовательного учреждения высшего образования Министерства Обороны РФ Военно-Медицинской академии им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ярославский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

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

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

Автореферат разослан «___» _____ 2023 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук Ордян Наталья Эдуардовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Ионизирующее излучение является не имеющим аналогов физическим фактором, оказывающим повреждающее воздействие на все ткани и системы органов, в том числе на желудочно-кишечный тракт (ЖКТ). Лучевая травма кишки может развиваться при облучении всего тела в результате техногенных аварий и радиационных инцидентов, а также как осложнение после лучевой терапии опухолей у онкологических больных (Khan et al., 2015; Козина и др., 2021). При облучении в дозах более 6 Гр развивается острый радиационный желудочно-кишечный синдром (Gastro-Intestinal Acute Radiation Syndrome, GIARS), характеризующийся поражением ЖКТ вследствие повреждения кишечного барьера (Dubois et al., 1998; Garau et al., 2011). В связи с этим актуальными научными проблемами являются как фундаментальное исследование молекулярных основ лучевого поражения кишечника, так и поиск средств предупреждения повреждения кишечного барьера в результате облучения.

Эпителий кишечника является многофункциональным тканевым барьером, который обеспечивает процессы транспорта ионов и макромолекул, а также защиту от проникновения микроорганизмов из просвета во внутреннюю среду организма. Латеральные поверхности эпителиоцитов слизистой оболочки кишечника объединены комплексами плотных контактов, которые обеспечивают целостность эпителия, а также селективный межклеточный транспорт ионов, воды и органических макромолекул (Tsukita et al., 2019). Основными молекулярными детерминантами плотных контактов являются белки семейства клаудина, среди которых выделяют снижающие и повышающие проницаемость эпителия для ионов и воды (Günzel, Yu, 2013). Кроме клаудинов, в состав плотных контактов входят белки семейства TAMP (Tight junction–Associated MARVEL Proteins), в частности окклюдин и трицеллюлин, регулирующие проницаемость кишечного барьера для макромолекул (Krug et al., 2009; Raleigh et al., 2010).

Показано, что ионизирующее излучение способно влиять на экспрессию белков плотных контактов в кишечнике млекопитающих. Так, разнонаправленное изменение уровня клаудина-2, -3 и -4 в подвздошной кишке крыс было обнаружено после абдоминального воздействия ионизирующего излучения в дозе, вызывающей развитие GIARS (Shim et al., 2015). После облучения тела мышей в дозе ниже диапазона, характерного для GIARS, было обнаружено перераспределение окклюдина, клаудина-3, а также актинового цитоскелета в тканях подвздошной и толстой кишки (Shukla et al., 2016). Эти данные указывают на высокую чувствительность межклеточных контактов

эпителиоцитов кишечника к ионизирующему излучению, однако комплексного исследования роли реорганизации плотных контактов в нарушении функционирования кишечного барьера при лучевом поражении на сегодняшний день не было проведено. Открытым вопросом является и дозо-чувствительность кишечного эпителия, в частности, степень изменения уровня и локализации белков плотных контактов при воздействии излучения в разных дозах. Поиск молекулярных детерминант, изменение которых при облучении даже в малых дозах предупреждает появление функциональных нарушений кишечного барьера, является актуальной проблемой.

В отношении радиобиологического ответа в кишечнике наблюдается градиент: лучевая реакция тонкой кишки характеризуется выраженной радиочувствительностью, в то время как толстая кишка оказывается более радиоустойчивой (Freeman et al., 2001; Cameron et al., 2012). Это связывают с большей уязвимостью стволовых клеток крипты тонкой кишки по сравнению с толстой; меньшее значение поглощенной дозы необходимо для опустошения крипты тонкой кишки, денудации ворсинки и, как следствие, полного исчезновения барьера в тонкой кишке (Cameron et al., 2012; Hua et al., 2017). Вместе с тем известно, что для молекулярных компонентов плотных контактов характерно сегмент-зависимое распределение в кишечнике в соответствии со степенью выраженности транспортных и барьерных функций (Markov et al., 2010). Несмотря на наличие упомянутых исследований, демонстрирующих изменение уровня белков плотных контактов в кишечнике млекопитающих при облучении, вопрос о связи радиочувствительности разных сегментов ЖКТ с распределением мозаики белков плотных контактов остается невыясненным.

Регуляция барьерных функций кишки может осуществляться посредством ряда белков, функционально ассоциированных с плотными контактами. Одним из таких белков является Na,K-АТФаза, обеспечивающая электрохимический градиент ионов натрия и калия в живых клетках. Ингибирование комплекса Na,K-АТФазы предотвращает образование плотных контактов, а модуляция активности различных субъединиц Na,K-АТФазы приводит к изменению уровня клаудинов в тканях (Rajasekaran et al., 2003, 2007; Larre et al., 2010, 2014; Rajamanickam et al., 2017). В качестве инструмента для модуляции работы Na,K-АТФазы используют ее специфический лиганд уабаин (Kravtsova et al., 2020). Уабаин является эндогенным стероидным соединением, которое синтезируется в коре надпочечников и гипоталамусе и определяется в системном кровотоке в диапазоне наномолярных концентраций (Schoner et al., 2000). Ранее было показано протективное

действие уабаина в условиях патогенного воздействия на кишечный барьер, например, при липополисахарид-индуцированном нарушении функций кишки (Markov et al., 2020). Данных о протективном эффекте уабаина в условиях лучевого поражения кишечника, а также об изменении белков плотных контактов и проницаемости эпителия кишки при сочетанном действии уабаина и ионизирующего излучения, на сегодняшний день нет.

Таким образом, **целью** данного исследования является изучение роли белков плотных контактов в обеспечении барьерных функций тощей и толстой кишки крыс при воздействии ионизирующего излучения, а также при введении уабаина.

Задачи исследования:

1. Анализ дозо- и сегмент-зависимого воздействия облучения на электрофизиологические параметры и межклеточную проницаемость тощей и толстой кишки крыс.
2. Морфометрический анализ тканей тощей и толстой кишки крыс в условиях лучевого воздействия.
3. Определение уровня и локализации белков плотных контактов методами Вестерн-блот и иммунофлуоресценции в тощей и толстой кишке при воздействии излучения.
4. Изучение электрофизиологических параметров, межклеточной проницаемости тощей и толстой кишки крыс при воздействии излучения в условиях введения уабаина.
5. Морфометрический анализ тканей тощей и толстой кишки крыс, а также изучение уровня и локализации белков плотных контактов при воздействии ионизирующего излучения в условиях введения уабаина.

Научная новизна. Впервые с использованием комплекса физиологических и молекулярно-биологических методов продемонстрировано дозо- и сегмент-специфичное воздействие ионизирующего излучения на барьерные функции кишечного эпителия крысы, опосредованное разной степенью реорганизации комплексов плотных контактов. Так, впервые показано, что облучение в дозе 10 Гр приводит к существенной перестройке плотных контактов в тощей кишке (обнаружено повышение уровня клаудина-1, -2, -3, -4, окклюдина и снижение уровня трицеллюлина) по сравнению с толстой кишкой крысы (где идентифицировано повышение уровня клаудина-2, -4). Эти данные отражают разную степень радиочувствительности сегментов кишечника. Кроме того, впервые показано, что излучение в дозе 2 Гр вызывает изменение уровня клаудина-3 в эпителии тощей кишки без изменения проницаемости кишечного барьера. К приоритетным результатам относятся данные о том, что введение уабаина предотвращает вызванное облучением нарушение

барьерных функций толстой кишки. Впервые установлено, что протективное действие уабаина в условиях радиационного поражения опосредовано предотвращением повышения уровня клаудина-2.

Теоретическая и практическая значимость работы. Показанное в работе дозо- и сегмент-зависимое изменение барьерных свойств тощей и толстой кишки, опосредованное изменением молекулярного состава плотных контактов, вносит вклад в изучение молекулярных основ и механизмов регуляции тканевых барьеров. Обнаружение протективного эффекта введения уабаина в отношении лучевой травмы толстой кишки открывает путь к разработке новых соединений для выработки тактики предупреждения и лечения функциональных расстройств кишечника при радиационном поражении. Результаты диссертации используются в специализированных курсах для магистров («Частная эндокринология», «Спецглавы по физиологии»), читаемых на биологическом факультете Санкт-Петербургского государственного университета, а также могут быть использованы при чтении курсов для студентов медицинских вузов.

Методология и методы исследования. С использованием ex vivo модели (исследование сегментов тощей и толстой кишки крыс Вистар) выполнено две серии экспериментов. В первой серии производили облучение животных в дозах 2 и 10 Гр с последующим исследованием дозо- и сегмент-специфичности воздействия излучения на электрофизиологические характеристики и межклеточную проницаемость для флуоресцентного зонда, измеренные в камере Уссинга. Проводилось исследование гистологической структуры тканей тощей и толстой кишки методами светооптической микроскопии, а также измерение уровня белков плотных контактов и активированной каспазы-3 методом Вестерн-блот. Во второй серии экспериментов все перечисленные методики использовали для изучения барьерных свойств тощей и толстой кишки крыс при воздействии ионизирующего излучения в дозе 10 Гр в условиях введения уабаина. Иммуноферментный анализ проводили для оценки концентрации уабаина в сыворотке крови. Метод иммунофлуоресцентного анализа с визуализацией сигнала на конфокальном микроскопе использовали для оценки локализации белков плотных контактов.

Положения, выносимые на защиту.

1. Степень нарушения кишечного барьера при воздействии ионизирующего излучения носит сегмент-специфичный характер, опосредованный изменением уровня белков плотных контактов в тощей и толстой кишке.

2. Воздействие ионизирующего излучения в дозе 2 Гр, не превышающей порога для развития острого радиационного желудочно-кишечного синдрома, приводит к повышению уровня клаудина-3 в тощей кишке крыс без изменения проницаемости кишечного барьера.

3. Уабаин оказывает протективное действие в условиях радиационного поражения, предотвращая вызванное облучением нарушение кишечного барьера и повышение уровня клаудина- 2 в эпителии толстой кишки.

Личный вклад автора. Автор участвовал в разработке концепции научного исследования и внес решающий вклад в обсуждение дизайна экспериментов. Эксперименты по работе с животными и анализ результатов проведены автором лично либо при его непосредственном участии.

Степень достоверности. Применение релевантных поставленным задачам электрофизиологических и молекулярно-биологических методов позволило получить достоверные результаты. 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 международных рецензируемых журналах, а также при представлении докладов по теме диссертации на конференциях.

Апробация результатов исследования. По материалам диссертации опубликовано три статьи в международных рецензируемых журналах (2021 - “Physiological reports”; 2022, 2023 - “International Journal of Molecular Sciences”), индексируемых в базах данных Scopus и WoS. Результаты работы были представлены для обсуждения на всероссийских и международных конференциях, таких как VII съезд физиологов стран СНГ с международным участием, международная конференция молодых ученых «Фундаментальная наука и клиническая медицина - человек и его здоровье», конференция с международным участием «Наука СПбГУ – 2020». По результатам конференций были опубликованы тезисы докладов.

Финансовая поддержка работы. Часть работы была профинансирована грантом РНФ №18-15-00043 «Молекулярное разнообразие и функциональное взаимодействие Na,K-АТФазы и клаудинов» (руководитель гранта – д.б.н., профессор И. И. Кривой).

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа содержит 135 страниц машинописного текста и включает список сокращений, обзор литературы, описание

материалов и методов, результаты, их обсуждение и выводы. Список литературы включает 252 источника. В работе представлены 3 таблицы и 27 рисунков.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Использованные животные, дизайн экспериментов. Во всех сериях экспериментов использовали самцов крыс Вистар (250-280 г). Протокол экспериментов соответствовал требованиям, изложенным в директиве 2010/63/EU по экспериментам на животных.

В первой серии экспериментов по выявлению дозо- и сегмент-зависимости воздействия ионизирующего излучения крысы (n=20) были разделены на 4 группы: а) интактные животные, не подвергавшиеся никакому воздействию, б) ложно-облученные животные, подвергавшиеся процедуре ложного облучения, в) животные, облученные в дозе 2 Гр, г) животные, облученные в дозе 10 Гр. Через 72 ч после облучения проводилось умерщвление животных с последующим забором крови для анализа уровня лейкоцитов, а также извлечением фрагментов тощей и толстой кишки для проведения опытов в камере Уссинга и дальнейшего молекулярного анализа.

Во второй серии экспериментов для исследования лучевого повреждения тканей тощей и толстой кишки в условиях введения уабаина животные (n=26) были разделены на 4 группы: а) «Контроль» – подвергались внутрибрюшинным инъекциям физиологического раствора в течение 6 сут, на 4-е сут подвергнуты процедуре ложного облучения, б) «Уабаин» – подвергались внутрибрюшинным инъекциям уабаина в дозе 1 мкг/кг массы в течение 6 сут, на 4-е сутки подвергнуты процедуре ложного облучения, в) «Радиация 10 Гр» – подвергались инъекциям физиологического раствора в течение 6 сут, на 4-е сут подвергнуты процедуре облучения в дозе 10 Гр, г) «Уабаин + Радиация 10 Гр» - подвергались инъекциям уабаина в дозе 1 мкг/кг массы в течение 6 сут, на 4-е сутки подвергнуты процедуре облучения в дозе 10 Гр. Через 72 ч после облучения (на 7-е сутки эксперимента) проводилось умерщвление животных с последующим извлечением фрагментов тощей и толстой кишки для проведения опытов в камере Уссинга и дальнейшего молекулярного анализа.

Процедура облучения животных. Во всех сериях экспериментов проводилось однократное острое внешнее облучение всего тела крыс с использованием рентгеновского аппарата РУМ-17. В течение процедуры облучения животные были помещены в закрытый

бокс из оргстекла, полностью ограничивающий их движение. Фокусное расстояние до рентгеновской трубки составляло 50 см; мощность дозы – 0.31 Гр/мин. Для процедуры ложного облучения животных помещали в бокс под выключенную рентгеновскую трубку. Процедура облучения проводилась совместно с к.м.н. А.В.Завирским на базе кафедры военной токсикологии и медицинской защиты Военно-медицинской академии им. Кирова.

Регистрация электрофизиологических параметров в камере Уссинга. Камера Уссинга представляла собой полые цилиндры, между которыми монтировали фрагменты ткани кишки. Регистрация значения тока «короткого замыкания», характеризующего процессы активного транспорта, осуществлялась при краткосрочной фиксации напряжения на 0 мВ. Для определения трансэпителиального сопротивления (ТЭС), отражающего барьерные функции ткани, регистрировали напряжение при фиксации тока на величине 10 мкА.

Изучение межклеточной проницаемости тощей и толстой кишки в камере Уссинга. Для измерения межклеточной проницаемости кишки 50 мкл флуоресцеина натрия помещали в камеру Уссинга с апикальной стороны для получения концентрации 0.1 мМ. Раствор с базолатеральной стороны собирали через 60 мин инкубации для определения концентрации диффундировавшего через ткань флуоресцеина натрия.

Оценка уровня лейкоцитов в крови крыс после воздействия ионизирующего излучения. Свежую цельную кровь инкубировали не более чем на 2-3 часа при 4°С. Содержание лейкоцитов в крови измеряли с помощью автоматического гематологического анализатора XN-1000. Для подсчета сегментоядерных нейтрофилов и лимфоцитов изготавливали тонкие мазки крови, окрашенные азур II-эозином по Романовскому-Гимза. Мазки анализировали с помощью светового микроскопа Leica DMI6000, выполняя подсчет относительного содержания нейтрофилов и лимфоцитов на 100 обнаруженных лейкоцитов.

Измерение концентрации уабаина в сыворотке крови крыс методом иммуноферментного анализа. Свежую цельную кровь отбирали у крыс во второй серии экспериментов, после чего отделяли сыворотку путем центрифугирования. Концентрация уабаина в сыворотке крови крыс была измерена с помощью набора для иммуноферментного анализа CEV857Ge по протоколу производителя с применением мультимодального ридера SPECTROstar. Эксперименты проведены совместно с д.б.н. В.В. Кравцовой.

Изучение гистологической структуры кишки методом световой микроскопии с количественной морфометрией. Фрагменты тощей и толстой кишки помещали в раствор 10% формалина сразу после иссечения на 48 ч. Процедура заливки в парафиновые блоки и нарезки ткани проводилась по описанной ранее методике (Burgel et al., 2002). После процесса депарафинизации в ксилоле и дегидратации в батарее спиртов с нисходящей концентрацией срезы окрашивались гематоксилином (1 мин, 23°C) и эозином (30 сек, 23°C). Изображения срезов ткани получали с помощью светового микроскопа Leica DMI6000, оснащенного цифровой камерой. Морфометрический анализ полученных изображений проводили с помощью программного обеспечения ImageJ.

Изучение уровня белков плотных контактов, а также активированной каспазы-3 методом Вестерн-блот. Для определения уровня белков семейства клаудина, окклюдина, трицеллюлина и активированной каспазы-3 использовался метод Вестерн-блот в модификации Stain-Free. Фрагменты ткани тощей и толстой кишки подвергались механической гомогенизации, лизаты получали в RIPA буфере, содержащем ингибиторы протеаз. Для разделения белков по молекулярной массе использовался вертикальный электрофорез в Stain Free геле. Электроперенос на PVDF мембраны осуществлялся полусухим методом при постоянном напряжении 25 В. Для детекции сигнала использовали первичные мышиные антитела против клаудина-2 и окклюдина и кроличьи антитела против клаудина-1, -3, -4, трицеллюлина, каспазы-3, а также вторичные антимышиные и антикроличьи антитела с HRP-меткой. Детекцию хемилюминесцентного сигнала осуществляли на анализаторе изображений Chemi-Doc XRS+. Белки интереса нормализовали на общий белок.

Иммунофлуоресцентный анализ локализации клаудина-2 во фрагментах тканей тонкой и толстой кишки. Срезы тканей тонкой и толстой кишки изготавливали на предметных стеклах SuperFrostPlus**.** Перед нанесением антител срезы подвергались депарафинизации в ксилоле и дегидратации в батарее спиртов с нисходящими концентрациями. Для определения локализации белков плотных контактов стекла инкубировали с первичными мышиными антителами к клаудину-2 и красителем DAPI для визуализации клеточных ядер. Детекция сигнала проводилась с помощью лазерного конфокального сканирующего микроскопа Leica TCS SP5.

Статистическая обработка полученных данных. Статистический анализ выполняли с помощью программного обеспечения GraphPad Prism v.8. При обработке результатов измерения динамики электрофизиологических параметров в течение 60 мин в

камере Уссинга, а также массы тела, применяли двухфакторный дисперсионный анализ с корректировкой Тьюки. При анализе уровня белков, концентрации уабаина, морфометрических параметров, а также проницаемости ткани применяли однофакторный дисперсионный анализ с корректировкой Тьюки. При сравнении уровня лейкоцитов использовали непараметрический критерий Манна-Уитни. Данные представлены как среднее значение ± стандартная ошибка средней. Значение $p<0.05$ рассматривали как статистически достоверное.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение дозо- и сегмент-специфичного воздействия ионизирующего излучения на барьерные функции тощей и толстой кишки крыс

Динамика массы тела животных после облучения. Интактные животные (n=6) непрерывно набирали вес в течение измерений (рис. 1а). Ложное облучение приводило к достоверному снижению массы тела животных относительно интактной группы ($p<0.05$). Масса тела животных в группе «2 Гр» также была также достоверно ниже, чем у интактных

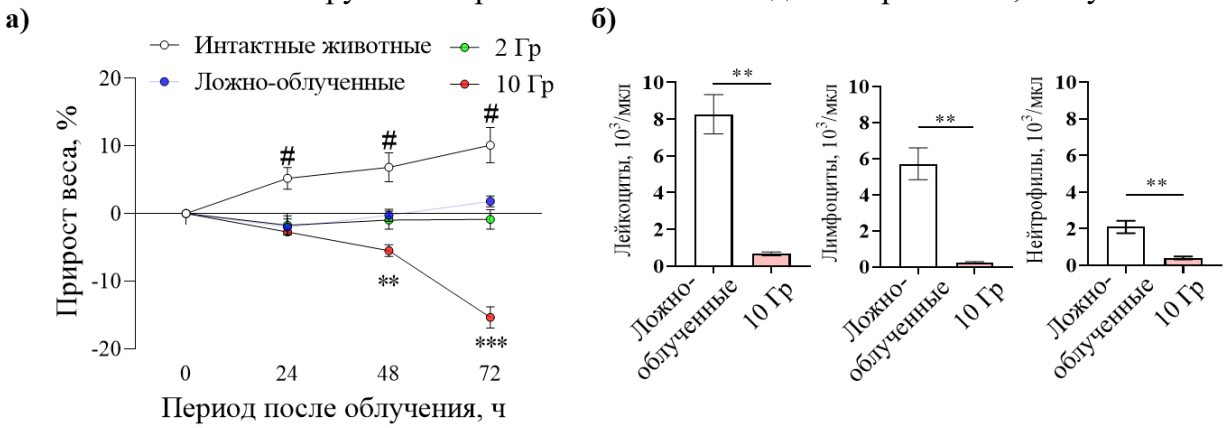

Рис. 1. Изменение массы тела крыс (а) и общего количества лейкоцитов, лимфоцитов и нейтрофилов (б) при воздействии ионизирующего излучения
*Достоверные отличия: ** p<0.01, *** p<0.001 – «10 Гр» vs. «Ложно-облученные»; # p<0.05- «Интактные» vs. «Ложно-облученные»*

животных (n=4, $p<0.05$), но не отличалось от ложно-облученных (рис. 1а). Облучение в дозе 10 Гр приводило к значительной потере массы тела по сравнению как с интактными, так и с ложно-облученными животными ($p<0.001$). В этой группе при визуальном осмотре животных обнаруживали признаки лучевого поражения: профузную диарею, прорежение шерстного покрова, носовую геморрагию, описанные ранее (Huang et al., 2019). В ходе проведения экспериментов гибель животных по причине лучевого воздействия не была зафиксирована.

Животные, подвергнутые процедуре ложного облучения, отличались от интактных животных по динамике массы тела, в связи с чем в качестве контроля для дальнейших исследований была выбрана ложно-облученная группа.

Оценка уровня лейкоцитов в крови крыс после воздействия ионизирующего излучения. В группе ложно-облученных крыс (n=4) было выявлено 8.3 ± 1.1·10^3/мкл лейкоцитов, что соответствует нормальным гематологическим показателям (WHO, 1971) (рис.1б). Облучение в дозе 10 Гр вызвало снижение уровня лейкоцитов в 13 раз по сравнению с ложно-облученными крысами (0.6 ± 0.1·10^3/мкл, n=6, $p<0.01$). У ложно-облученных крыс было выявлено 5.7 ± 0.9 · 10^3/мкл лимфоцитов и 2.1 ± 0.3 · 10^3/мкл сегментоядерных нейтрофилов. В группе «10 Гр» было подсчитано 0.3 ± 0.1 · 10^3/мкл лимфоцитов и 0.3 ± 0.1 · 10^3/мкл сегментоядерных нейтрофилов. Таким образом, облучение сопровождалось значительной лучевой лейкопенией, что соответствует ожидаемой гематологической картине, наблюдаемой при облучении крыс в дозе 10 Гр (Mihandoost et al., 2014).

Электрофизиологические характеристики и межклеточная проницаемость тощей и толстой кишки крыс после воздействия ионизирующего излучения

Трансэпителиальное сопротивление (ТЭС). У интактных животных (n (число фрагментов ткани)=24) в тощей кишке значение ТЭС к 5-й минуте составляло 76 ± 7 Ом·см^2, к 60-й минуте – 54 ± 5 Ом·см^2 (рис. 2а). Процедура ложного облучения (n=16) и облучение в дозе 2 Гр (n=16) не изменяли величину ТЭС в тощей кишке. Облучение в дозе 10 Гр вызывало пятикратное снижение ТЭС в тощей кишке по сравнению с ложно-облученной группой ($p<0.001$). В толстой кишке у интактных животных (n=24) к 5-й минуте зарегистрировали значение ТЭС 64 ± 4 Ом·см^2, к 60-й минуте 56 ± 5 Ом·см^2. Процедура ложного облучения (n=16), а также облучение в дозе 2 Гр (n=16) не оказывали влияния на значение ТЭС в толстой кишке. Сопротивление значительно снизилось в толстой кишке в группе особей, облученных в дозе 10 Гр (n=24), по сравнению с ложно-облученными животными ($p<0.01$): к 5-й минуте регистрировали ТЭС 42 ± 2 Ом·см^2, к 60-й минуте 45 ± 3 Ом·см^2 (рис.2б).

Ток «короткого замыкания». У интактных животных (n=24) к 5-й минуте регистрировали значение тока равное 17 ± 2 мкА, к 60-й минуте 10±2 мкА. Ложное облучение (n=16), а также облучение в дозе 2 Гр (n=16) не приводило к изменению тока в тощей кишке. В группе «10 Гр» (n=24) ток в тощей кишке был значительно повышен по сравнению с ложно-облученными особями ($p<0.01$): к 5-й минуте регистрации в группе

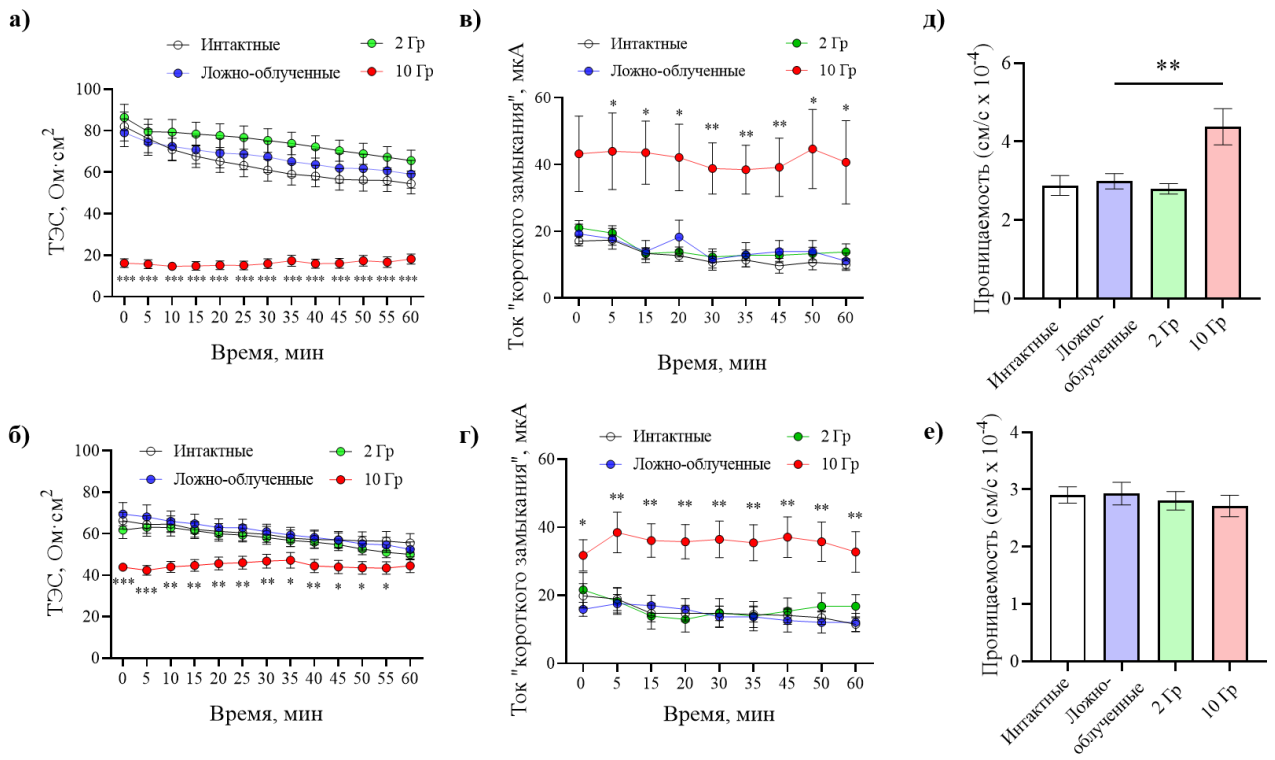

Рис. 2. Изменение электрофизиологических параметров и межклеточной проницаемости тощей (а, в, д) и толстой (б, г, е) кишки крысы при воздействии ионизирующего излучения
а, б) Трансэпителиальное сопротивление (ТЭС); в, г) ток «короткого замыкания» в течение 60 мин регистрации в камере Уссинга; д, е) проницаемость для флуоресцеина натрия
*Достоверные отличия: * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 – группа «10 Гр» vs. «Ложно-облученные»*

«10 Гр» ток составил 44 ± 11 мкА, к 60-й минуте – 41 ± 12 мкА (рис. 2в). В толстой кишке у интактных животных (n=24) к 5-й минуте регистрировали значение тока 19 ± 3 мкА, к 60-й минуте 12 ± 2 мкА. В группах «Ложно-облученные» (n=16) и «2 Гр» (n=16) ток не отличался от интактных животных в течение всей регистрации. Облучение в дозе 10 Гр приводило к повышению тока «короткого замыкания» (p<0.01): к 5-й минуте ток в группе «10 Гр» (n=24) составил 38 ± 6 мкА, к 60-й минуте 33 ± 6 мкА (рис. 2г).

Межклеточная проницаемость для флуоресцеина натрия. Межклеточная проницаемость тощей кишки для флуоресцеина натрия не отличалась в группах интактных (n=24) и ложно-облученных животных (n=16) (2.9 ± 0.3 см/с·10^{-4} и 3.0 ± 0.2 см/с·10^{-4}, соответственно, рис. 2д). В группе животных, облученных в дозе 2 Гр (n=16), значения межклеточной проницаемости также не отличались от интактных или ложно-облученных животных. Облучение в дозе 10 Гр (n=24) приводило к достоверному повышению проницаемости тощей кишки для флуоресцеина натрия по сравнению с ложно-облученными животными (4.4 ± 0.5 и 3.0 ± 0.2 см/с·10^{-4}, соответственно, p<0.01). Межклеточная проницаемость толстой кишки для флуоресцеина натрия не отличалась ни в одной из исследованных групп (рис. 2е).

Таким образом, ионизирующее излучение дозо-зависимо воздействовало на барьерные функции кишки: при воздействии в дозе 10 Гр в тощей и толстой кишке наблюдалось одновременное снижение ТЭС и повышение тока «короткого замыкания», в то время как доза 2 Гр не вызывала изменений. Стоит отметить, что в толстой кишке облучение в дозе 10 Гр приводило к снижению ТЭС на 23%, в то время как в тощей кишке при облучении в той же дозе ТЭС снизилось на 76%. Кроме того, межклеточная проницаемость для флуоресцеина натрия при облучении в дозе 10 Гр повышалась только в тощей кишке. Эти результаты свидетельствуют о сегмент-зависимом эффекте излучения и о повышенной радиорезистентности толстой кишки по сравнению с тощей.

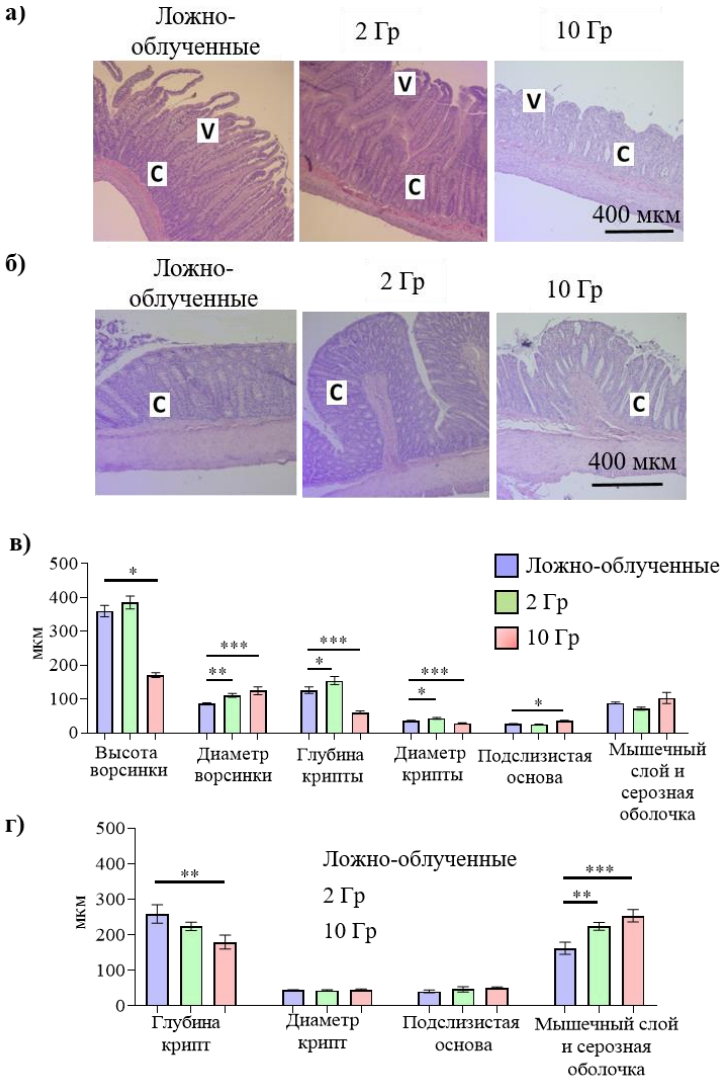

Рис. 3. Гистологическое строение тощей и толстой кишки крыс через 72 ч после облучения

а) Срезы тощей и б) толстой кишки крысы, окрашенные гематоксилин-эозином. С – крипта, V – ворсинка, в) Морфометрические параметры тощей и г) толстой кишки крыс после облучения

*Достоверные отличия: * p<0.05, ** p<0.01, ***p<0.001 – группы «2 Гр» или «10 Гр» vs. «Ложно-облученные»*

Гистологическое строение тощей и толстой кишки после воздействия ионизирующего излучения

Срезы кишки ложно-облученных животных (n (количество исследованных срезов)=60) рассматривали как контроль. В группе «2 Гр» (n=60) было обнаружено достоверное увеличение диаметра ворсинки тощей кишки, а также глубины и ширины крипты по сравнению с ложно-облученными особями ($p<0.05$, рис. 3а, в). Толщина стенки тощей кишки не изменялась при облучении в дозе 2 Гр. В группе «10 Гр» наблюдали укорочение ворсинок и увеличение их диаметра, а также уменьшение глубины и диаметра крипт по сравнению с контролем ($p<0.05$). Толщина стенки тощей кишки увеличивалась при облучении в дозе 10 Гр по сравнению с контролем за счет утолщения подслизистой основы ($p<0.001$).

В толстой кишке при облучении в дозе 2 Гр (n=60) не изменялось строение крипт, но происходило увеличение толщины стенки за счет мышечных слоев и серозной оболочки ($p<0.05$, рис. 3б, г). Облучение в дозе 10 Гр (n=60) вызвало значительное уменьшение глубины крипт ($p<0.01$), а также увеличение толщины стенки за счет мышечных слоев и серозной оболочки ($p<0.001$).

Результаты отражают дозо-зависимое воздействие радиации на строение тощей и толстой кишки. На сегмент-специфичность эффекта излучения указывает то, что в тощей кишке при воздействии дозы 10 Гр изменялась толщина подслизистой основы, а в толстой кишке – мышечных слоев и соединительнотканной оболочки.

Анализ уровня белков плотных контактов и активированной каспазы-3 в тощей и толстой кишке методом Вестерн-блот после воздействия ионизирующего излучения

В образцах тощей кишки от ложно-облученных крыс (n=4) обнаруживались следующие белки: клаудины-1, -2, окклюдин, трицеллюлин, а также активированная каспаза-3 (рис. 4а, в). Облучение в дозе 2 Гр (n=4) приводило к появлению в тощей кишке клаудина-3, в отличие от ложно-облученной группы, где этот белок не идентифицировали. Доза 10 Гр (n=4) приводила к увеличению уровня клаудина-1, -2 и окклюдина, к появлению клаудина-3, -4, а также к снижению уровня трицеллюлина и исчезновению активированной каспазы-3 в тощей кишке по сравнению с ложно-облученными крысами ($p<0.05$).

В толстой кишке в группе ложно-облученных крыс (n=4) идентифицировали клаудин-1, -2, -3, -4, окклюдин, трицеллюлин и активированную каспазу-3 (рис. 4б, г). При воздействии радиации в дозе 2 Гр (n=4) ни один из исследуемых белков в толстой кишке не изменился. Облучение в дозе 10 Гр (n=4) достоверно повышало уровень клаудина-2 и -4 в толстой кишке.

Полученные результаты указывают на дозо- и сегмент-зависимый эффект облучения в отношении белков плотных контактов: существенно изменились уровни белков в тощей кишке при облучении в дозе 10 Гр, в то время как доза 2 Гр вызывала повышение только клаудина-3. В толстой кишке доза 10 Гр изменяла уровни только клаудинов-2 и -4.

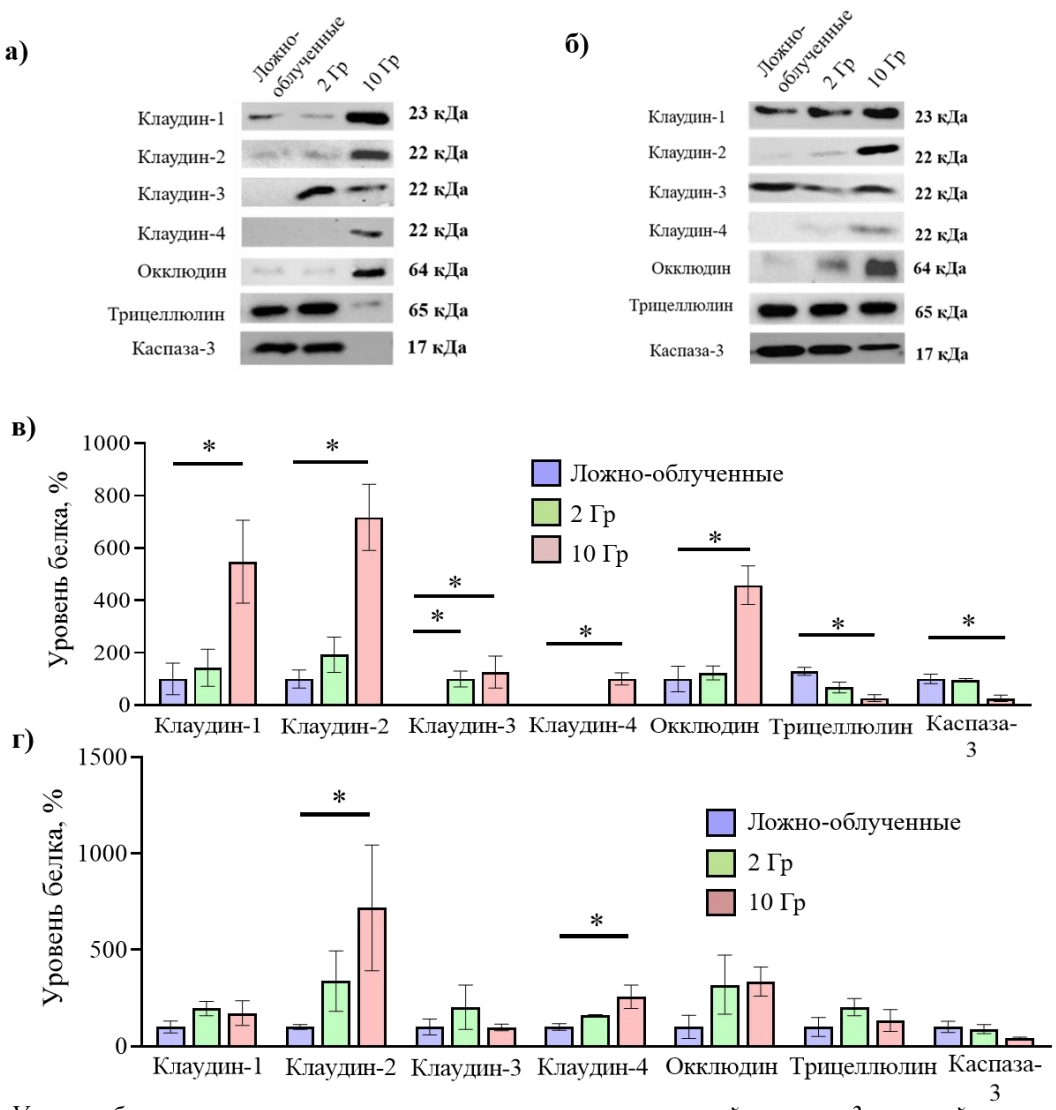

Рис. 4. Уровень белков плотных контактов, а также активированной каспазы-3 в тощей и толстой кишке крыс через 72 ч после облучения.
а) Изображения бэндов на оригинальных PVDF мембранах, соответствующих белкам в тощей и б) толстой кишке. в) Уровень белков в тощей и г) толстой кишке, оцененный по результатам анализа денситометрии хемилюминесцентного сигнала от PVDF мембран
*Достоверные отличия: *p<0.05, ** p<0.01, ***p<0.001 – группы животных, облученных в дозах 2 Гр или 10 Гр, по сравнению с ложно-облученными животными*

<u>Барьерные функции тощей и толстой кишки крыс при воздействии ионизирующего излучения в условиях введения уабаина</u>

Динамика массы тела животных после воздействия ионизирующего излучения в условиях введения уабаина

У крыс из группы «Контроль» (n=6) на протяжении всего эксперимента масса тела достоверно не изменялась (рис. 5а). Облучение в дозе 10 Гр вызывало снижение массы тела животных через два дня после процедуры (n=7) ($p<0.05$) (рис. 5а). Группа «Уабаин» (n=6), не отличалась по динамике изменения массы тела от контроля на протяжении всего эксперимента. В группе «Уабаин + Радиация 10 Гр» (n=7) динамика массы тела не отличалась от группы «Радиация 10 Гр». Таким образом, предварительное введение

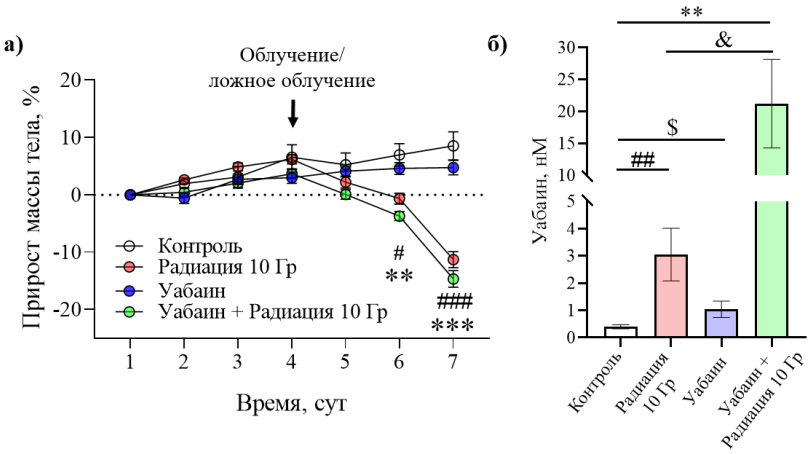

Рис. 5. Динамика массы тела животных (а) и концентрация уабаина в сыворотке крови (б) в экспериментах по воздействию ионизирующего излучения в условиях введения уабаина
*Достоверные отличия: # p<0.05, ## p<0.01, ### p<0.001 – «Радиация 10 Гр» vs. Контроль; ** p<0.01, *** p<0.001 – «Уабаин + Радиация 10 Гр» vs. Контроль; $ p<0.05 – «Уабаин» vs. Контроль; & p<0.05 – «Уабаин + Радиация 10 Гр» vs. «Радиация 10 Гр»*

уабаина не предотвращало потери массы тела, вызванной воздействием ионизирующего излучения.

Концентрация уабаина в сыворотке крови крыс при воздействии ионизирущего излучения в условиях введения уабаина

Концентрация уабаина в сыворотке крови контрольных животных составляла 0.40 ± 0.07 нМ (n=6). Облучение в дозе 10 Гр (n=7), а также введение уабаина (n=6) приводило к повышению концентрации уабаина до 3.1 ± 1.0 нМ и 1.04 ± 0.30 нМ, соответственно (p<0.05). Сочетанное применение уабаина и облучения в дозе 10 Гр вызывало значительное повышение концентрации (21.2 ± 6.9 нМ, n=7; p<0.05) уабаина в сыворотке крови крыс (рис. 5б).

Электрофизиологические характеристики тощей и толстой кишки крыс при воздействии ионизирующего излучения в условиях введения уабаина

Трансэпителиальное сопротивление (ТЭС). К 5-й мин регистрации ТЭС в контроле (n=24) в тощей кишке было 83 ± 8 Ом·см^2. Облучение в дозе 10 Гр приводило к пятикратному снижению ТЭС по сравнению с контролем (n=28, p<0.001). В группе «Уабаин» (n=24) ТЭС в тощей кишке не изменялось относительно контроля. В группе «Уабаин + Радиация 10 Гр» (n=28) ТЭС к 5-й минуте было равно 19 ± 2 Ом·см^2 (p<0.001). Предварительное введение уабаина не предотвращало снижения ТЭС в тощей кишке, вызываемого облучением (рис. 6а).

В толстой кишке в контрольной группе (n=24) к 5-й минуте регистрировали значение ТЭС 61 ± 2 Ом·см^2. Воздействие ионизирующего излучения в дозе 10 Гр (n=28) приводило к снижению ТЭС в толстой кишке (p<0.001). В группе «Уабаин» (n=24) ТЭС не отличалось от контрольных значений. Предварительное введение уабаина предотвращало снижение ТЭС, вызванное облучением: значение ТЭС в толстой кишке в группе «Уабаин + Радиация 10 Гр» было достоверно выше, чем в группе «Радиация 10 Гр» до 25-й минуты регистрации и не отличалось от контроля в течение всей регистрации (рис. 6б).

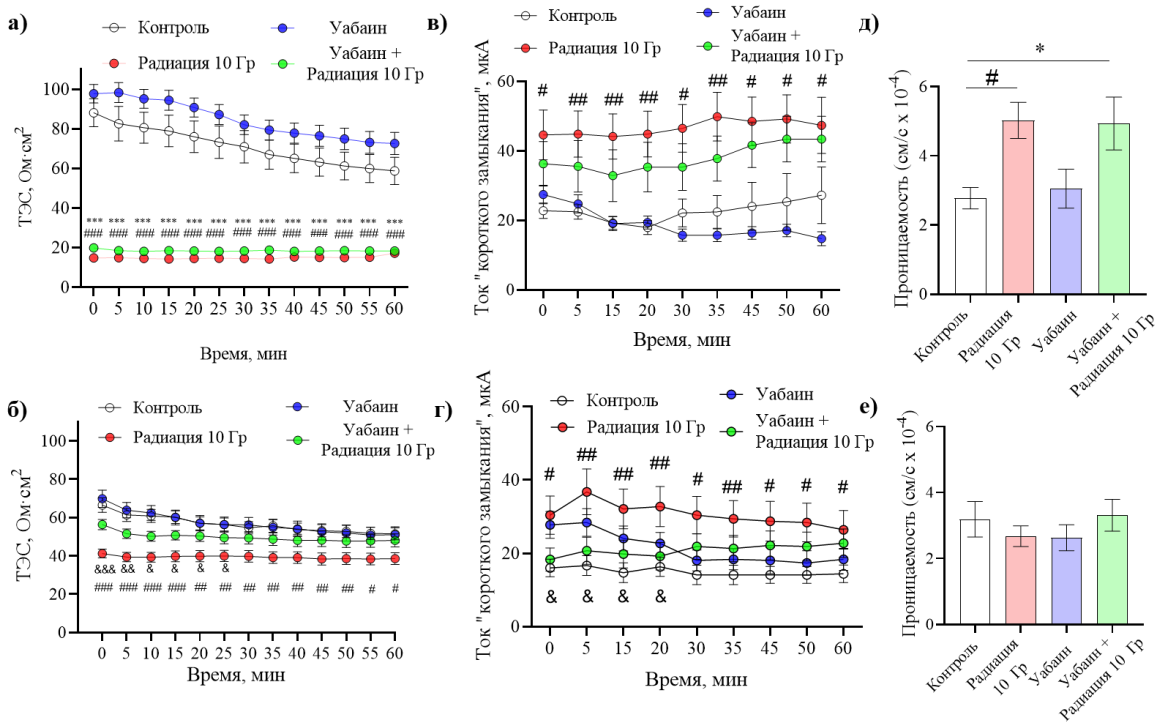

Рис. 6. Изменение электрофизиологических параметров и межклеточной проницаемости тощей (а,в,д) и толстой кишки (б, г, е) крысы при воздействии ионизирующего излучения в условиях введения уабаина
а, б) Трансэпителиальное сопротивление (ТЭС) в течение 60 мин регистрации в камере Уссинга; в, г) ток «короткого замыкания» в течение 60 мин регистрации в камере Уссинга; д, е) проницаемость для флуоресцеина натрия

*Достоверные отличия: # p<0.05, ## p<0.01, ### p<0.001 – «Радиация 10 Гр» vs. Контроль; *p<0.05, *** p<0.001 – «Уабаин + Радиация 10 Гр» vs. Контроль; & p<0.05, && p<0.01, &&& p<0.001 «Уабаин + Радиация 10 Гр» vs. «Радиация 10 Гр»*

Ток «короткого замыкания». Облучение в дозе 10 Гр (n=28) приводило к увеличению тока «короткого замыкания» в тощей кишке по сравнению с контролем (22 ± 2 мкА и 49 ± 8 мкА, соответственно, p<0.01). В группе «Уабаин» (n=24) ток «короткого замыкания» не изменялся по сравнению с контролем (n=28). Ток в тощей кишке в группе «Уабаин + Радиация 10 Гр» (n=28) не отличался ни от контроля, ни от группы «Радиация 10 Гр» (рис. 6в).

В толстой кишке в контроле (n=24) ток составил 17 ± 3 мкА к 5-й минуте регистрации. Радиация в дозе 10 Гр приводила к повышению тока по сравнению с контролем (n=28, p<0.05). В группе «Уабаин» (n=24) ток не отличался от контроля в течение регистрации в камере Уссинга. Инъекции уабаина предотвращали повышение тока короткого замыкания, вызванного облучением, в толстой кишке: к 5-й минуте в группе «Уабаин + Радиация 10 Гр» регистрировали ток 21 ± 4 мкА, что было достоверно ниже, чем в группе «Радиация + 10 Гр» (p<0.05) и не отличалось от контроля (рис. 6г).

Межклеточная проницаемость для флуоресцеина натрия. В тощей кишке исходная проницаемость была $2.8 \cdot 10^{-4}$ см/с (n=24, рис. 6д). Воздействие ионизирующего излучения в дозе 10 Гр приводило к двукратному увеличению проницаемости тощей кишки по

сравнению с контролем (n=28, p<0.05). Инъекции уабаина (n=24) не вызывали изменения проницаемости тощей кишки по сравнению с контролем. В группе «Уабаин + Радиация 10 Гр» (n=28) проницаемость была двукратно увеличена по сравнению с контролем, схожим образом с группой «Радиация 10 Гр». Таким образом, введение уабаина не предотвращало повышения проницаемости тощей кишки, наблюдаемого при воздействии ионизирующего излучения.

Проницаемость для флуоресцеина натрия в толстой кишке не менялась по сравнению с контролем ни в одной из исследованных групп (рис. 6е).

Таким образом, инъекции уабаина не влияли на электрофизиологические параметры и проницаемость тощей и толстой кишки. Тем не менее, применение уабаина перед облучением в дозе 10 Гр оказывало сегмент-специфичный протективный эффект на барьерные свойства толстой, но не тощей кишки. Уабаин предотвращал снижение ТЭС и повышение тока «короткого замыкания», вызываемых облучением, в толстой кишке. В тощей кишке не обнаружено изменений электрофизиологических параметров между группами «Радиация 10 Гр» и «Уабаин + Радиация 10 Гр».

Морфометрический анализ строения тощей и толстой кишки после воздействия ионизирующего излучения в условиях введения уабаина

Облучение в дозе 10 Гр (n (количество исследованных срезов)=60) вызывало укорочение ворсинок и увеличение их диаметра в тощей кишке (p<0.001 и p<0.05, соответственно). Кроме того, в этой группе наблюдалось уменьшение глубины крипт без изменения их диаметра, а также увеличение толщины стенки за счет подслизистой основы

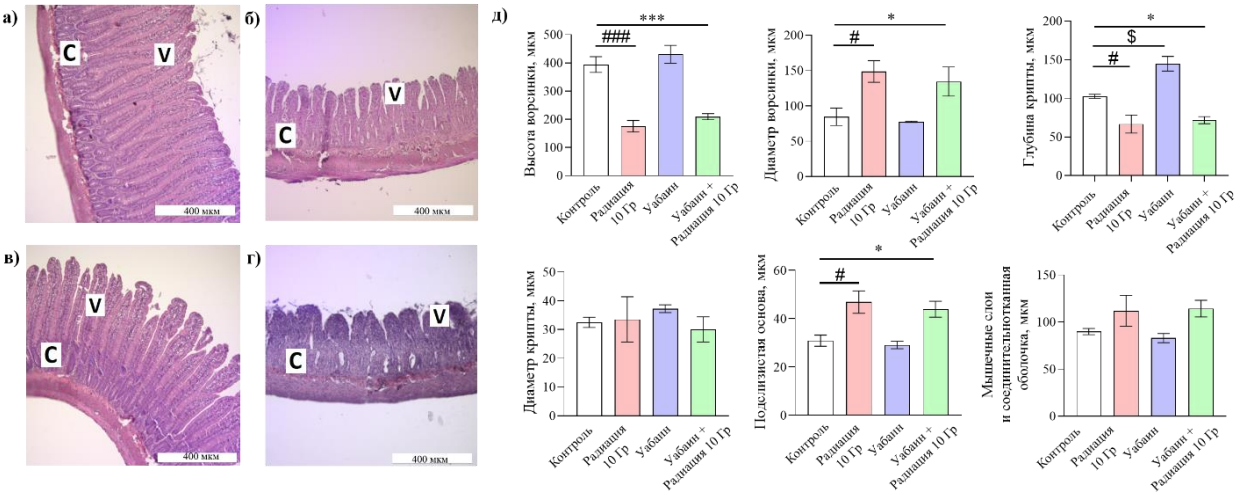

Рис 7. Гистологическое строение тощей кишки крыс при воздействии ионизирующего излучения в условиях введения уабаина

а) Контроль б) Радиация 10 Гр в) Уабаин г) Уабаин + Радиация 10 Гр д) Морфометрические параметры тощей кишки

*С – крипта, V – ворсинка. Достоверные отличия: # p<0.05, ### p<0.001 – «Радиация 10 Гр» vs. Контроль; * p<0.05, ***p<0.001 – «Уабаин + Радиация 10 Гр» vs. Контроль; $ p<0.05 – «Уабаин» vs. Контроль*

(p<0.05). Инъекции уабаина увеличивали только глубину крипт по сравнению с контролем (группа «Уабаин», n=60, p<0.01). В группе «Уабаин + Радиация 10 Гр» (n=60) измеренные морфометрические параметры не отличались от группы «Радиация 10 Гр» (рис. 7).

В толстой кишке облучение в дозе 10 Гр вызывало уменьшение глубины крипты (n=60, p<0.001) и увеличение толщины стенки толстой кишки за счет мышечных слоев и соединительнотканной оболочки (p<0.05) (рис. 8). Воздействие уабаина не вызывало изменений морфологии ткани толстой кишки по сравнению с контролем (группа «Уабаин», n=60). Инъекции уабаина частично компенсировали уменьшение глубины крипты, вызванное облучением: в группе «Уабаин + Радиация 10 Гр» глубина крипты была

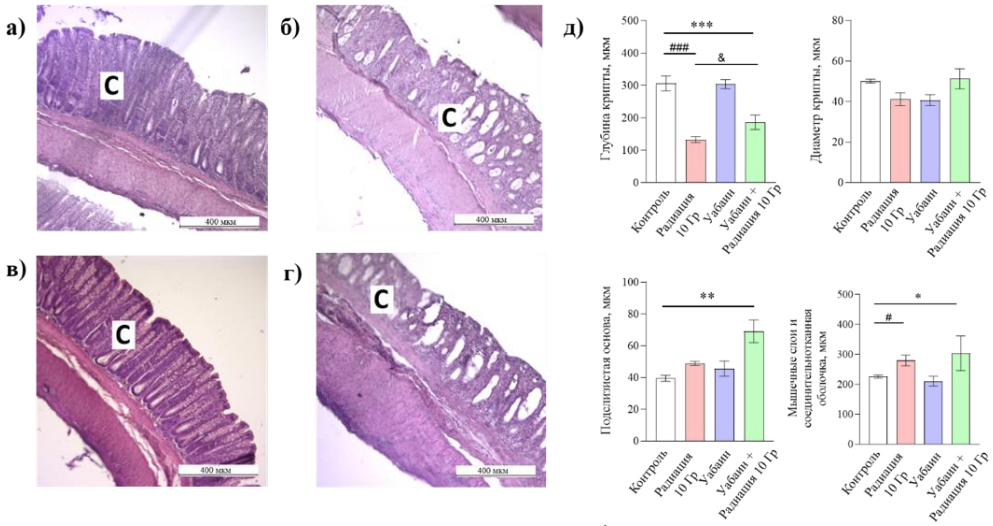

Рис. 8. Гистологическое строение толстой кишки крыс при воздействии ионизирующего излучения в условиях введения уабаина
а) Контроль б) Радиация 10 Гр в) Уабаин г) Уабаин + Радиация 10 Гр д) Морфометрические параметры толстой кишки

*С – крипта. Достоверные отличия: # p<0.05, ### p<0.001 – «Радиация 10 Гр» vs. Контроль; * p<0.05, **p<0.01, *** p<0.001 – «Уабаин + Радиация 10 Гр» vs. Контроль; $ p<0.05 – «Уабаин» vs. Контроль*

достоверно больше, чем в группе «Радиация 10 Гр» (p<0.05), но ниже, чем в контроле (p<0.001). Однако уабаин не предотвратил утолщение мышечных слоев, вызываемое воздействием ионизирующего излучения (рис. 8). Кроме того, инъекции уабаина в сочетании с облучением приводили к увеличению толщины подслизистой основы по сравнению с контролем (p<0.01).

Анализ уровня белков плотных контактов тощей и толстой кишки после воздействия ионизирующего излучения в условиях введения уабаина

В группе «Радиация 10 Гр» уровень клаудина-1 и -2 был значительно повышен в тощей кишке по сравнению с контролем (n=4, p<0.05). Кроме того, у этой группы животных идентифицировались клаудин-3 и -4, которые не были обнаружены у

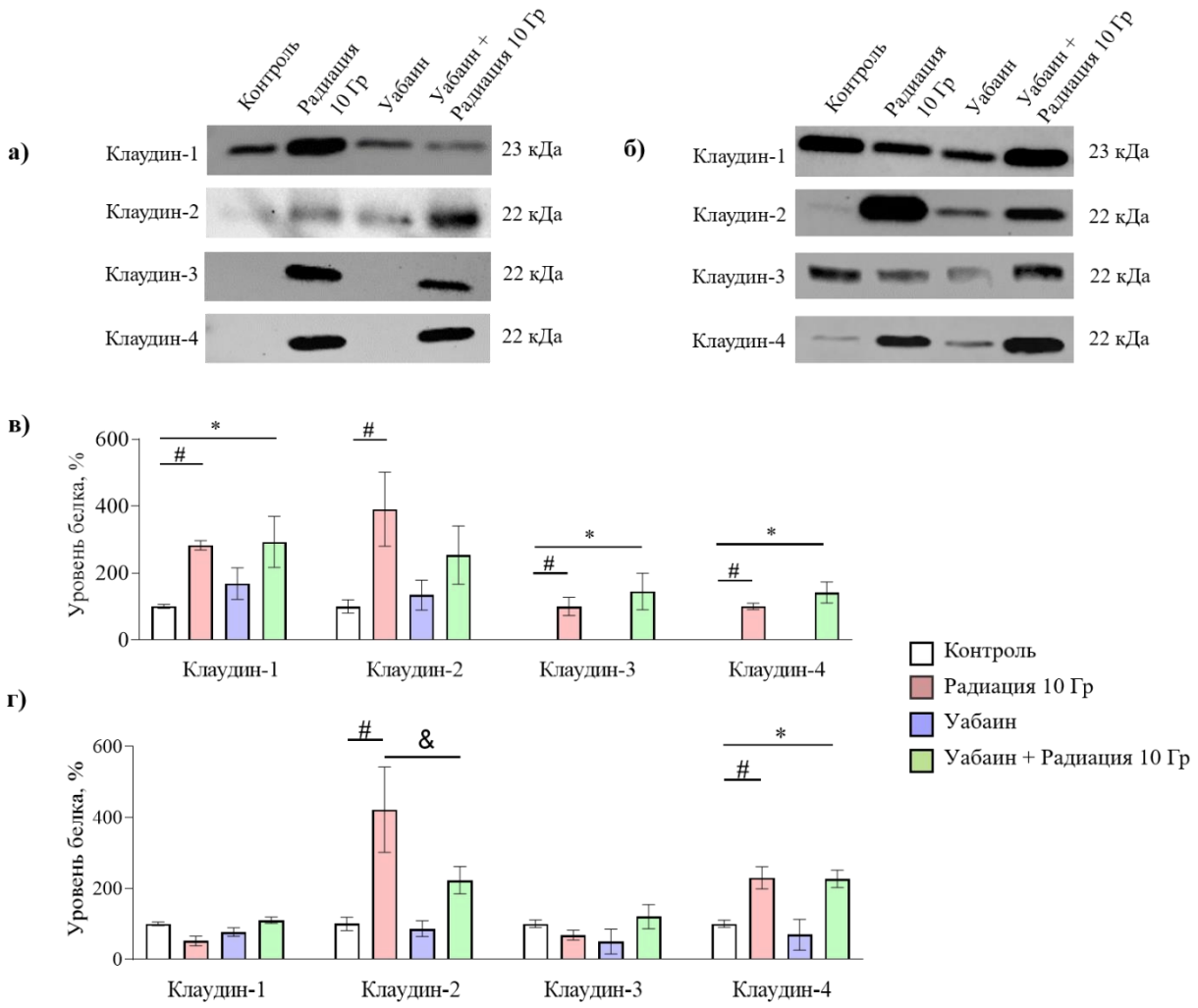

Рис. 9. Оценка уровня белков семейства клаудина в тощей (а, в) и толстой кишке (б, г) крыс при воздействии излучения в условиях введения уабаина
а, б) Изображения бэндов на оригинальных PVDF мембранах, полученных методом Вестерн- блот; в, г) уровень белков, оцененный по результатам анализа денситометрии хемилюминесцентного сигнала от PVDF мембран
Достоверные отличия: # p<0.05 – «Радиация 10 Гр» vs. Контроль; p<0.05 – «Уабаин + Радиация 10 Гр» vs. Контроль; & p<0.05 – «Уабаин + Радиация 10 Гр» vs. «Радиация 10 Гр»*

контрольной группы. Ионизирующее излучение вызывало повышение уровня окклюдина и снижение трицеллюлина по сравнению с контролем, а также снижение уровня активированной каспазы-3 ($p<0.05$). Введение уабаина не оказывало воздействия на уровень изученных белков в тощей кишке (группа «Уабаин», n=4, рис. 9, 10). В группе «Уабаин + Радиация 10 Гр» (n=4) уровень белков плотных контактов в тощей кишке не отличался от полученных в группе «Радиация 10 Гр». Таким образом, уабаин не предотвращал изменения уровня белков плотных контактов и активированной каспазы-3, вызываемого облучением в тощей кишке.

В толстой кишке в группе «Радиация 10 Гр» (n=4) были значительно повышены уровни клаудина-2 и -4 по сравнению с контролем ($p<0.05$). Введение уабаина без последующего облучения не приводило к изменению уровня белков в толстой кишке (группа «Уабаин», n=4). Применение уабаина перед облучением предотвращало

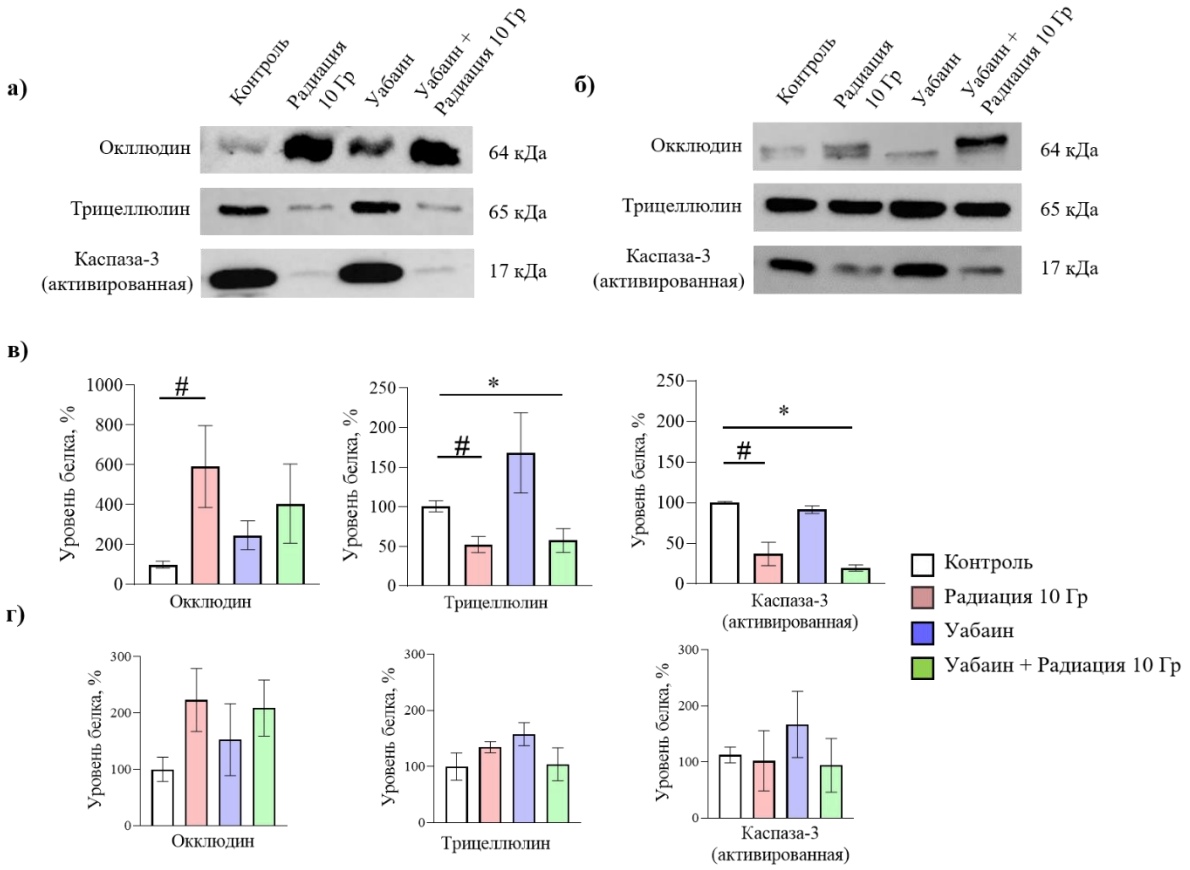

Рис. 10. Оценка уровня окклюдина, трицеллюлина и активированной каспазы-3 в тощей (а, в) и толстой (б, г) кишке крыс при воздействии излучения в условиях предварительного введения уабаина
а, б) Изображения бэндов на оригинальных PVDF мембранах, полученных методом Вестерн-блот; в, г) Уровень белков, оцененный по результатам анализа денситометрии хемилюминесцентного сигнала от PVDF мембран
Достоверные отличия: # p<0.05 – «Радиация 10 Гр» vs. Контроль; p<0.05 – «Уабаин + Радиация 10 Гр» vs. Контроль*

увеличение уровня клаудина-2 и не влияло на повышенный уровень клаудина-4: в группе «Уабаин + Радиация 10 Гр» уровень клаудина-2 был значительно ниже, чем в группе «Радиация 10 Гр». Уровни окклюдина, трицеллюлина, а также активированной каспазы-3 в толстой кишке не отличались ни в одной из исследованных групп.

Исследование локализации клаудина-2 тощей и толстой кишки после воздействия ионизирующего излучения в условиях введения уабаина

В тощей кишке флуоресцентный сигнал клаудина-2 идентифицировался на клеточных мембранах эпителиоцитов ворсинок (рис 11). Облучение в дозе 10 Гр приводило к изменению характера распределения клаудина-2: в группе «Радиация 10 Гр» появлялся сигнал в виде отдельных точек вместо сплошной линии (рис. 11). В группе «Уабаин» не было обнаружено перераспределения клаудина-2 в пределах ткани тощей кишки. В группе «Уабаин + Радиация 10 Гр» характер распределения сигнала от клаудина-2 не отличался от такового в группе «Радиация 10 Гр». В толстой кишке клаудин-2 локализовался в ткани преимущественно в эпителиоцитах, обращенных к просвету кишки

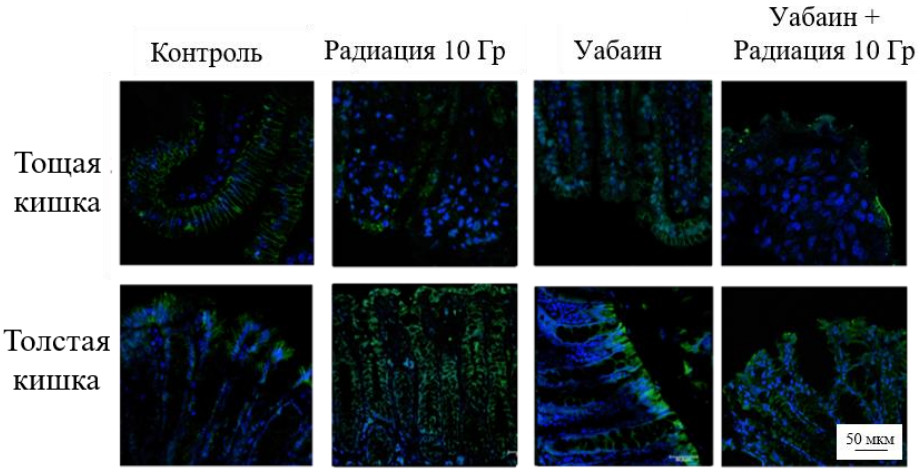

Рис. 11. Распределение клаудина-2 в тощей и толстой кишке крыс при воздействии ионизирующего излучения в условиях введения уабаина
Зеленое свечение — клаудин-2; синее свечение — окраска ядер флуоресцентным красителем DAPI. Масштабная линейка– 50 мкм.

(рис. 11). В группе «Радиация 10 Гр» интенсивность сигнала от клаудина-2 была выше, чем в контроле, при этом сигнал был распределен равномерно вдоль всей крипты, а не только в обращенной к просвету части. В группе «Уабаин + Радиация 10 Гр» сигнал от клаудина-2 был менее интенсивным и был локализован схожим образом с контролем. Полученные результаты указывают на то, что в толстой кишке лучевое воздействие изменяет распределение клаудина-2, что удается частично компенсировать инъекциями уабаина.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ионизирующее излучение оказывает повреждающее воздействие на все системы органов организма, в том числе на желудочно-кишечный тракт. Воздействие ионизирующего излучения в дозах, превышающих 6 Гр, приводит к развитию острого радиационного желудочно-кишечного синдрома (GIARS) - неизлечимому и смертельному состоянию, которое может развиться при общем и локальном облучении. При GIARS целостность кишечного эпителия нарушается, что приводит к существенному повреждению кишечного барьера. Актуальными научными направлениями являются фундаментальное исследование молекулярных основ лучевого поражения кишечника и поиск фармакологических агентов, оказывающих протективный эффект в отношении излучения. В основе целостности кишечного барьера лежит комплекс плотных контактов, которые имеют сегмент-специфичный молекулярный состав в разных отделах кишечника. Основными задачами данного исследования была оценка дозо- и сегмент-зависимого воздействия ионизирующего излучения на барьерные свойства тощей и толстой кишки крыс, а также на уровень и локализацию белков плотных контактов. Кроме того, анализировали возможность предотвращения повреждающего эффекта ионизирующего излучения с помощью инъекций уабаина в наномолярных концентрациях. В основе этой идеи лежало представление об уабаине как об эндогенном гормоне, который оказывает

протективный эффект в условиях патогенных воздействий на кишечный барьер (Markov et al., 2020).

Результаты свидетельствуют о дозо- зависимом воздействии ионизирующего излучения на барьерные свойства тощей и толстой кишки, а также на морфологию этих сегментов и уровень белков плотных контактов. Облучение в дозе 2 Гр, которая ниже диапазона доз, вызывающих GIARS, не приводило к изменению электрофизиологических характеристик и проницаемости тощей и толстой кишки. Изменение только клаудина-3 среди всех исследованных белков плотных контактов при облучении в дозе 2 Гр может указывать на его важную роль в регуляции механизмов радиобиологического ответа при облучении даже в дозах, не способных вызвать развитие GIARS. В этих условиях повышение уровня клаудина-3 может быть связано с его неканонической функцией модулятора клеточной пролиферации (Okugawa et al., 2012; Cao et al., 2021). Облучение в дозе 10 Гр приводило к существенному нарушению барьерных функций, повышению проницаемости (в тощей кишке), повреждению структуры тканей и разнонаправленному изменению уровня белков плотных контактов в тощей и толстой кишке. Это указывает на то, что облучение в дозе 10 Гр приводит к повреждению кишечного барьера, и этот эффект сопровождается изменениями в структуре плотных контактов.

Воздействие ионизирующего излучения на тощую и толстую кишку крыс носило сегмент-зависимый характер. Так, в тощей кишке облучение приводило к многократному изменению электрофизиологических характеристик и межклеточной проницаемости, сопровождающемуся видимым повреждением слизистой и подслизистой основы. Эти результаты сопровождались значительным изменением в тощей кишке уровня всех изученных белков плотных контактов: клаудина -1, -2, -3, -4, окклюдина, трицеллюлина. В толстой кишке при облучении в дозе 10 Гр наблюдалось менее значительное изменение электрофизиологических параметров, отсутствие изменения межклеточной проницаемости, изменение морфометрических параметров крипт и толщины мышечных слоев стенки без повреждения подслизистой основы. В толстой кишке при облучении повышались уровни только клаудина -2, -4. Полученные результаты указывают на различие тощей и толстой кишки по степени радиочувствительности, опосредованное разным молекулярным составом и разной степенью реорганизации комплексов плотных контактов при облучении.

Предварительное введение уабаина в дозе 1 мкг/кг в течение четырех дней до облучения и двух дней после имело протективный эффект в отношении ионизирующего

излучения в толстой, но не в тощей кишке крыс. Введение уабаина предотвращало снижение ТЭС (барьерные свойства) и тока «короткого замыкания» (транспортные свойства) толстой кишки, частично компенсировало уменьшение глубины крипт, вызванное облучением в дозе 10 Гр. Указанные эффекты сопровождались предотвращением повышения уровня и перераспределения клаудина-2, наблюдаемого в толстой кишке при облучении. Полученные результаты указывают, что обнаруженный протективный эффект уабаина в условиях облучения опосредован регуляцией клаудина-2 в толстой кишке.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о дозо- и сегмент-зависимом воздействии ионизирующего излучения на барьерные функции тощей и толстой кишки крыс, опосредованные специфичными для сегмента молекулярным составом и чувствительностью плотных контактов. Применение уабаина предотвращает дисфункцию эпителия толстой кишки при индуцированном излучением повреждении.

ВЫВОДЫ

1. Облучение в дозе 2 Гр не изменяет трансэпителиальное сопротивление, ток «короткого замыкания» и межклеточную проницаемость сегментов кишки крыс. Облучение в дозе 10 Гр снижает трансэпителиальное сопротивление и повышает ток «короткого замыкания», что свидетельствует о дозо-зависимом воздействии ионизирующего излучения на барьерные функции кишки крысы.

2. Облучение в дозе 2 Гр приводит к повышению уровня клаудина-3 в тощей кишке и не изменяет уровень белков плотных контактов в толстой кишке. Доза 10 Гр вызывает повышение уровня клаудина-1, -2, -3, -4 и окклюдина, снижение трицеллюлина в тощей кишке и повышение клаудина-2, -4 в толстой кишке. Изменение уровня белков плотных контактов сопровождает дозо-зависимые функциональные изменения барьерных функций сегментов кишки при радиационном воздействии.

3. В толстой кишке облучение в дозе 10 Гр приводит к снижению трансэпителиального сопротивления на 23% и не изменяет межклеточную проницаемость. В тощей кишке при облучении в той же дозе трансэпителиальное сопротивление снижается на 76%, что сопровождается увеличением межклеточной проницаемости. В тощей кишке изменяется уровень клаудина-1,-2,-3,-4, окклюдина и трицеллюлина, в то время как в толстой кишке изменяется только уровень клаудина-2, -4. Это свидетельствует о сегмент-зависимом эффекте ионизирующего излучения на барьерные свойства кишки крысы и о повышенной радиорезистентности толстой кишки по сравнению с тощей.

4. Введение уабаина оказывает протективный эффект на барьерные функции толстой, но не тощей кишки крысы, в условиях облучения. Повышение уабаина в сыворотке крови предотвращает снижение трансэпителиального сопротивления и увеличение тока «короткого замыкания», вызванного лучевым воздействием. Указанный эффект сопровождается предотвращением повышения уровня клаудина-2 в этом сегменте.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи по теме диссертации в рецензируемых журналах:

1. Livanova A.A., Fedorova A.A., Zavirsky A.V., Bikmurzina A.E., Krivoi I.I., Markov A.G. Dose and time dependence of functional impairments in rat jejunum following ionizing radiation exposure // Physiol. Rep. – 2021. – V.9. – N.15. – P. 14960.

2. Kravtsova V.V., Fedorova A.A., Tishkova M.V., Livanova A.A., Vetrovoy O.V., Markov A.G., Matchkov V.V., Krivoi I.I. Chronic Ouabain Prevents Radiation-Induced Reduction in the α2 Na,K-ATPase Function in the Rat Diaphragm Muscle // Int. J. Mol. Sci. – 2022. –V.23. – N.18. – P.10921.

3. Livanova A.A., Fedorova A.A., Zavirsky A.V., Krivoi I.I., Markov A.G. Dose- and Segment-Dependent Disturbance of Rat Gut by Ionizing Radiation: Impact of Tight Junction Proteins // Int. J. Mol. Sci. – 2023. – V.24 – N.2. – P.1753.

Тезисы докладов:

1. Ливанова А.А. Уровень белков плотных контактов эпителиоцитов изменяется при лучевом поражении тощей кишки крыс // Фундаментальная наука и клиническая медицина — человек и его здоровье. – 2022. – С. 537.

2. Ливанова А.А. Исторические аспекты поиска маркеров воздействия ионизирующего излучения на организм человека // Всероссийская конференция по естественным и гуманитарным наукам «Наука СПбГУ – 2020». – 2020. – С. 317-318.

3. Ливанова А.А., Федорова А.А., Фатыйхов И.Р., Завирский А.В., Кривой И.И., Марков А.Г. Ионизирующее излучение нарушает барьерные и транспортные свойства эпителия тощей и толстой кишки крыс // VII Съезд физиологов СНГ. – 2021. – Т.1. – С.118.

4. Тишкова М. В., Кравцова В. В., Кривой И. И., Марков А. Г., Ливанова А. А., Федорова А. А., Сабурова Е. А. Ионизирующее излучение нарушает электрогенез и функционирование Na,K-АТФазы в диафрагме крысы // XVIII Международный междисциплинарный конгресс «Нейронаука для медицины и психологии». – 2022. – С.185-185.