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

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

диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук

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

> Санкт-Петербург 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4					
ВВЕДЕНИЕ	6					
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	12					
1.1. Кишечный эпителий как тканевой барьер	12					
1.2. Комплекс плотных контактов	Комплекс плотных контактов19					
1.3. Сегмент-специфичность барьерных функций, про	оницаемости и					
молекулярного состава плотных контактов в ра	азных отделах					
кишечника	25					
1.4. Воздействие ионизирующего излучения на ЖКТ						
1.5. Стратегии предотвращения повреждающего воздействи	1Я					
ионизирующего излучения: поиск радиопротекторов						
1.6. Функциональное взаимодействие Na,K-ATФазы и ее ин	нгибитора					
уабаина с плотными контактами в норме и при патолог	ии41					
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	45					
2.1. Дизайн экспериментов, использованные животные	45					
2.2. Процедура облучения животных	46					
2.3. Регистрация электрофизиологических параметров в камер	е Уссинга47					
2.4. Изучение межклеточной проницаемости различных уча	астков кишки с					
помощью флуоресицеина натрия	48					
2.5. Оценка уровня лейкоцитов в крови крыс посл	е воздействия					
ионизирующего излучения	49					
2.6. Измерение концентрации уабаина в сыворотке крови	крыс методом					
иммуноферментного анализа						
2.7. Изучение гистологической структуры кишки мето	олом световой					
микроскопии с количественной морфометрией						
2.8. Изучение комплекса белков плотных контактов метоло	м Вестерн-блот					
анализа						
2.9 Иммунофпуоресцентное исследование покализации б	елков плотных					
контактов в фрагментах тканей тонкой и толстой кишки	57					
2.10. Статистическая обработка результатов	57					

3.1. Динамика веса и общее состояние животных после облучения......59

ОБСУЖДЕНИЕ	103
выводы	107
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АДФ аденозиндифосфат
- АТФ аденозинтрифосфат
- Гр Грей, единица измерения поглощенной дозы
- ДНК дезоксирибонуклеиновая кислота
- ЖКТ желудочно-кишечный тракт

кДа – килодальтон

- ЛД50 полулетальная доза
- ЛПС липополисахарид
- МСК мультипотентные стволовые клетки
- нм нанометры
- ОЛБ острая лучевая болезнь
- ТЭС трансэпителиальное сопротивление
- ЭДТА этилендиаминтетрауксусная кислота
- 5-ASA 5-аминосалициловая кислота
- BSA бычий сывороточный альбумин
- Caco-2 эпителиальные клетки аденокарциномы толстой кишки (human epithelial
- colorectal adenocarcinoma cells)
- Cxs коннексины
- DSB двуцепочечный разрыв
- Dsc десмоколины
- Dsg десмоглеины
- ЕСН внеклеточная спираль
- ECL внеклеточная петля
- FCGBP Fc Gamma Binding Protein
- FITС флуоресцеин-5-изотиоцианат
- GIARS острый радиационный желудочно-кишечный синдром
- GLP-2 глюкагон-похожий пептид 2
- GSH глутатион
- HD5 дефензин человека 5
- IgA иммуноглобулин А
- IP3 инозитолтрифосфат

MDА – малоновый диальдегид

MDCК – линия клеток почти собаки Манин-Дарби

MUC2 – муцин второго типа

NAC – N-ацетил цистеин

NF-кВ – ядерный фактор кВ

РАМРѕ – патоген-ассоциированный молекулярный паттерн

PBS – фосфатный буфер

PBST – фосфатный буфер с добавлением Tween 20

 $PLC\gamma - фосфолипаза C \gamma$

 $RELM\beta$ – резистин-подобная молекула β

RIPA- буфер для радиоиммунопреципитации

SSB – одноцепочечный разрыв

T6SS – системы секреции шестого типа

TLR – Toll-like рецепторы

ТМЗ – трансмембранный регион 3

TNF- α – фактор некроза опухоли α

ZO – зонула окклюденс

введение

Актуальность темы исследования. Ионизирующее излучение является не физическим фактором, имеющим аналогов 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; Macià I 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 однако комплексного исследования излучению, 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). Преимущественно 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 выше 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-ATФаза, обеспечивающая электрохимический градиент ионов натрия и калия в живых клетках. Ингибирование комплекса Na,K-ATФазы дезорганизует и предотвращает образование плотных контактов, а модуляция

активности различных субъединиц Na,K-АТФазы приводит к изменению уровня клаудинов в разных 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 в норме 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.

 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 сегментспецифичное 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 уровня -4), повышение клаудина-2, что отражает 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 ех 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 электрофизиологические характеристики на 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 последующей 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-ATФазы и клаудинов» (руководитель гранта – д.б.н., профессор Игорь Ильич 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.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Кишечный эпителий как тканевой барьер

В организме человека и животных тканевые барьеры защищают внутреннюю среду от проникновения патогенов, обеспечивают компартментализацию, опосредуют обмен веществ и энергии между организмом и окружающей средой за счет градиента ионов и макромолекул, а также транспортных процессов. Структурно-функциональная основа тканевых барьеров представлена слоем (или слоями) эпителиальных клеток, объединенных в единый механический пласт с помощью межклеточных контактов. Нормальное функционирование тканевых барьеров необходимо для обеспечения гомеостаза в организме, в то время как нарушение целостности приводит к развитию патологических процессов и воспалительных заболеваний (Marchiando et al., 2010).

Учитывая площадь поверхности, крупнейшим тканевым барьером, граничащим с окружающей средой, является кишечник. К функциям кишечного эпителия относится защита внутренней среды от проникновения патогенов и аллергенов, содержащихся в компонентах химуса, всасывание питательных веществ и выведение компонентов слизи, а также некоторых специфичных макромолекул (антимикробных) пептидов, секреторного IgA). В связи с наличием непосредственного контакта со средой, представленной компонентами химуса, желудочно-кишечный тракт одним из первых начинает реагировать на экзогенные воздействия различного генеза. Эпителиальные клетки кишечника находятся в постоянном контакте с множеством чужеродных антигенов, поступающих с пищей. Нарушение целостности кишечного барьера приводит К дисфункции пищеварительной системы, повышению проницаемости кишечного эпителия, проникновению патогенов в кровоток, развитию воспалительных состояний и аллергий (Borovik et al., 2013; Sánchez de Medina et al., 2014).

Функциональность кишечного барьера обеспечивается следующими факторами: 1) наличие слизи, содержащей молекулярные паттерны врожденного и адаптивного иммунитета, 2) непосредственное участие клеток слизистой в реакциях врожденного и адаптивного иммунитета, 3) комменсальная микробиота, конкурирующая с патогенными микроорганизмами в просвете кишечника, 4) клеточные и стромальные элементы от слизисто-эпителиального слоя до

сосудистого эндотелия, 5) регенеративный потенциал кишечного эпителия, обеспечиваемый клоногенными клетками крипт, 6) прочное объединение эпителиоцитов межклеточными контактами в единый пласт.

Слизь – внешний компонент кишечного барьера. Эпителий слизистой оболочки кишечника состоит из четырех основных типов клеток – абсорбирующих энтероцитов, бокаловидных клеток, клеток Панета и энтероэндокринных клеток. Бокаловидные клетки являются одноклеточными железами, секретирующими слизь. Их название соответствует форме клетки: апикальная часть имеет расширенный Собразный ободок цитоплазмы, называемый «текой», заполненный секретом, базальная часть заужена. Доля бокаловидных клеток среди всех компонентов слизистой увеличивается каудально от двенадцатиперстной кишки (4%) до дистального отдела толстой кишки (16%), аналогично градиенту числа микробных организмов, чье присутствие увеличивается от проксимальных отделов кишечника до толстой кишки (Шарапов и др., 2021). Основным компонентом слизи является муцин, необходимый для смазки и продвижения пищевого комка, а также для физической защиты эпителия от эндогенных и экзогенных агентов без нарушения транспортных процессов. В толстой и тонкой кишке в составе слизи, синтезируемой в просвет, превалирует свободный муцин второго типа (MUC2, муцин-2). Клетки кишечного эпителия также экспрессируют трансмембранные муцины (MUC1, MUC3, MUC4, MUC12, MUC13 и MUC17), которые остаются прикрепленными к апикальной поверхности и являются составной частью гликокаликса. Во внутреннем (30 мкм) и внешнем слоях (450 мкм) муцина зафиксированы различные антимикробные вещества, которые сами по себе функционируют в качестве элементов барьера кишки. К ним относятся иммуноглобулины (IgA, IgM, IgD), синтезируемые В-лимфоцитами собственной пластинки (lamina propria), а также антимикробные пептиды, секретируемые клетками Панета на дне крипт кишечника и комменсальной микробиотой. Слизь не прикреплена к поверхности эпителия, благодаря чему она движется вместе с перистальтическими волнами в дистальном направлении и способствует выведению содержимого кишечника. Структура ее относительно пористая и проницаемая для различных компонентов, в том числе для микроорганизмов. Тем не менее, задержанные в вязком слое слизи бактерии не контактируют с эпителиальными клетками кишечника непосредственно, за

исключением сегментированных филаментных бактерий в подвздошной кишке (Wells et al., 2017). Слизь, покрывающая эпителий, обеспечивает первую линию защиты от деструктивного влияния физических и химических факторов, вызванных потребляемой пищей, микробами и микробными токсинами.

Клеточные и стромальные элементы кишечного барьера. Стенка любого участка пищеварительной трубки состоит из нескольких слоев: 1) слизистая оболочка, состоящая из кишечного эпителия, собственной пластинки (lamina propria) и мышечной пластинки, 2) подслизистая основа, 3) мышечная оболочка из двух слоев гладких мышц и 4) серозная оболочка.

Поляризованный клеточный эпителий представляет собой монослой и состоит из клеток нескольких типов: абсорбирующих цилиндрических энтероцитов, бокаловидных клеток (клеток Гоблета), энтероэндокринных клеток (менее 1% клеточной популяции эпителия), клеток Панета и микроскладчатых клеток (Мклетки). Каёмчатые цилиндрические энтероциты составляют до 80% клеток эпителия кишечника. Они отвечают за поглощение ионов, воды, сахаров, пептидов и липидов. Нейроэндокринные клетки кишечника, секретирующие разнообразные биогенные амины и пептидные гормоны, наряду с аналогичными клетками желудка и поджелудочной железы, образуют гастроэнтеропанкреатическую эндокринную систему, являющуюся частью диффузной эндокринной системы. Клетки Панета в основном локализуются в криптах тонкой кишки. Их функция включает секрецию антимикробных пептидов (лизоцима, дефензинов, кателицидинов и др.), которые накапливаются в слое слизи, способствуя ее бактерицидной активности. Все эти терминально дифференцированные клетки погибают за счет активации программ апоптоза, удаляются путем эксфолиации и постоянно замещаются новыми в результате пролиферации особого пула клеток (истинные стволовые клетки или мультипотентные стволовые клетки, МСК) в отделе, занимающем нижние две трети крипты по её оси и отделенном более узким перешейком от верхней части (Проскуряков и др, 2009). У человека обновление кишечного эпителия осуществляется каждые 3–5 дней, что служит защитным механизмом для удаления инфицированных или поврежденных клеток (Пятченков и др., 2022; France et al., 2017).

В состав слизистой оболочки, помимо цилиндрического каемчатого эпителия, входит собственная пластинка (*lamina propria*), образующая строму ворсинок и подстилающая крипты, а также мышечная пластинка. Собственная пластинка содержит кровеносные и лимфатические сосуды, расположенные вдоль оси ворсинки, а также отдельные гладкие миоциты. Мышечная пластинка представлена двумя слоями гладких мышц. Подслизистая основа во всех сегментах ЖКТ образована рыхлой соединительной тканью, в которой находятся нервные ганглии и многочисленные кровеносные сосуды. В двенадцатиперстной кишке в ее составе встречаются разветвленные дуоденальные железы, выделяющие слизистый секрет. Одиночные и сгруппированные в виде Пейеровых бляшек лимфатические фолликулы располагаются в собственной и мышечной пластинке слизистой оболочки и углублены в подслизистую основу. В местах расположения лимфатических фолликулов кишечный эпителий имеет специфическое строение (фолликулярный эпителий) и, в отличие от ворсинчатого, не разделен на ворсинки и крипты (Фальчук, Марков, 2015; Markov et al., 2016).

Мышечная оболочка включает два слоя гладких мышц: внутренний циркулярный и наружный продольный, между которыми часто можно видеть интрамуральные ганглии межмышечного нервного сплетения. Наконец, самой наружной является серозная оболочка, которая включает мезотелий, рыхлую соединительную ткань и жировые клетки.

С функциональной точки зрения наиболее важным компонентом кишечного барьера является кишечный эпителий, непосредственно контактирующий с содержимым просвета кишки. Другие структуры, такие как кровеносные сосуды, слой гладкомышечных клеток и компоненты энтеральной нервной системы, поддерживают структурно-функциональную целостность кишечного барьера, регулируя специфические защитные реакции слизисто-эпителиальной оболочки в случаях ее повреждения (Bischoff et al., 2014).

Компоненты слизистой – участники реакций врожденного и адаптивного иммунитета. Основную роль во взаимодействии с антигенными компонентами пищи и микробиоты в просвете кишки играют Пейеровы бляшки – специфические элементы лимфоидной системы слизистой оболочки. Пейеровы бляшки представляют собой сгруппированные лимфоидные фолликулы, покрытые

специализированным фолликул-ассоциированным эпителием, характерной чертой которого является наличие микроскладчатых клеток (М-клеток), обеспечивающих захват, транспорт, процессинг и презентацию антигенных структур (Markov et al., 2016).

Резидентные клетки эпителиального пласта также могут принимать участие в защите кишечного барьера, опосредуя реакции врожденного и адаптивного иммунитета. Так, бокаловидные клетки и эпителиоциты секретируют биологически активные молекулы, такие как резистин-подобную молекулу-бета (RELMβ) и Fcгамма связывающий белок (FCGBP). RELMβ индуцирует экспрессию Reg в толстой кишке, что в свою очередь вызывает запуск NF-кВ сигналинга (Hogan et al., 2006). FCGBP образует стабилизированные дисульфидными мостиками гетеродимеры с муцином-2 в составе слизи; эти комплексы препятствуют связыванию бактерий с поверхностью эпителиоцитов и обеспечивают клиренс патогенов (Liu et al., 2022). Heдавние исследования также показали, что бокаловидные клетки могут выступать в качестве антигенпрезентирующих клеток, доставляя антигенный материал из просвета расположенным глубже в стенке дендритным клеткам (McDole et al., 2012).

Другим способом активации механизмов врожденного иммунитета является синтез антимикробных пептидов, который осуществляется клетками Панета. Известно, что клетки Панета тонкой кишки специфично секретируют альфадефензины HD5 и HD6 (Human Defensin 5, Human Defensin 6), способные связываться с поверхностью бактериальных клеток, содержащих кардиолипин и фосфатидилглицерол, и разрушать их (Sankaran-Walters et al., 2017). Другой антимикробный пептид, кателецидин, синтезируется эпителиальными клетками ворсинок и, как было показано, опосредует иммунный ответ против *Citrobacter rodentium* у грызунов (Iimura et al., 2005). 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.

Комменсальная микробиота. Все отделы ЖКТ заселены представителями бактерий, грибов, архей и простейших, которые заселяют просвет кишечника сразу после рождения. Состав микробиоты существенно различается в зависимости от условий и наличия нутриентов в разных отделах ЖКТ. В просвете тонкой кишки,

богатой моно- и дисахаридами, а также аминокислотами, преобладают бактерии Proteobacteria and Lactobacillales, в то время как в толстой кишке в связи с наличием крупных полисахаридов, находятся представители порядков Bacteroidales и Clostridiales, способные расщеплять эти соединения (Kamada et al., 2013, 2014). Симбионтные микроорганизмы вступают в конкурентные отношения с патогенной микрофлорой, инвазирующей просвет кишечника, реализуя прямые и косвенные механизмы резистентности к патогенам. К прямым относятся выделение бактерицидных молекул, таких как бактериоцины, бактериофаги, секреционная система 6-го типа (type 6 secretion systems, T6SS), способных вызывать гибель патогенных микроорганимов (Gillor et al., 2009; Duerkop et al., 2012; Russell et al., 2014). К косвенным механизмам относят способность симбионтов производить некоторые молекулы, которые снижают концентрацию кислорода и тем самым стимулируют метаболизм эпителиоцитов кишки (Pickard et al., 2017). Эти процессы являются ко-стимулирующими для запуска иммунного ответа путем взаимодействия патоген-ассоциированных молекулярных паттернов (pathogenassociate molecular patterns (PAMPs)) с рецепторами TLR через MyD88 на поверхности клеток многоклеточного организма (Franchi et al., 2012). Таким образом, комменсальная микробиота непосредственно или косвенно принимает участие в клиренсе инфекционных агентов, что позволяет рассматривать ее как один из компонентов кишечного барьера.

Межклеточные контакты между эпителиоцитами кишечного барьера. Выделяют четыре типа межклеточных контактов в кишечнике (плотные контакты, щелевидные контакты, десмосомы и адгезионные контакты), функционирование которых обеспечивает не только механическое соединение клеток, но и регулирует некоторые пути внутриклеточного сигналинга, структурную целостность тканей, поляризацию клеточного пласта. Десмосомы представляют собой устойчивую к разрыву структуру, которая присутствует в тканях, испытывающих частые механические нагрузки, таких как эпидермис кожи и ткань сердца. Как и в адгезивных контактах, взаимодействие в десмосомах опосредуется кадгеринами, связанными с промежуточными филаментами цитоскелета (Schlegel et al., 2021). У изоформами десмосомальных человека основными кадгеринов являются десмоглеины (Dsg 1-4) и десмоколины (Dsc 1-3), из которых в кишечнике

присутствуют Dsg2 и Dsc2. Недавно была продемонстрирована связь между десмосомами и плотными контактами в тонкой кишке: у Dsg-нокаутных мышей наблюдалось нарушение ультраструктуры десмосом и одновременное снижение уровня клаудина-1 и окклюдина в составе плотных контактов (Gross et al., 2018). Данные о непосредственной роли десмосом в организации кишечного барьера остаются противоречивыми. Так, мыши с нокаутом Dsc2 не проявляли признаков дисфункции барьера при индуцированном колите (Gross et al., 2018). При этом в другой работе при снижении уровня Dsc2 у мышей обнаруживали нарушение восстановления кишечного эпителия и более длительное заживление ран (Flemming et al., 2020). В то время как роль десмосом в организации эпидермиса кожи достаточно хорошо изучена, о десмосомах в кишечном эпителии данные остаются отрывочными.

Адгезионные контакты определяют полярность эпителиальных клеток, регулируют организацию нижележащего актинового цитоскелета и формируют центр для передачи клеточных сигналов и регуляции транскрипции различных генов (Takeichi, 2014). Основными молекулярными детерминантами В составе алгезионных контактов являются кадгерины, такие как Е-кадгерин. Цитоплазматический домен Е-кадгерина связывается с адапторными белками, а именно, альфа- и бета-катенинами и катенином p120. Кадгерин-катениновые комплексы взаимодействуют с нижележащими актиновыми микрофиламентами, регулируя организацию актинового цитоскелета (Michael et al., 2013; Daulagala et al., 2019). Прямое участие Е-кадгерина в обеспечении механической целостности кишечного барьера показано во многих работах, даже частичный нокаут по Екадгерину приводит к разрыву адгезионных контактов между эпителиоцитами и их отделению в просвет, а также снижению регенеративного потенциала кишечного эпителия (Schneider et al., 2010). Кроме того, Е-кадгерин и β-катенин принимают участие в канцерогенезе колоректального рака и воспалительных заболеваний толстой кишки через Wnt/ β -катенин сигналинг (Vlad-Fiegen et al., 2012; Serafino et al., 2014).

Щелевые контакты представляют собой межклеточные каналы, которые обеспечивают непосредственное взаимодействие цитоплазматических компартментов соседних клеток. Через щелевые контакты способны перемещаться

ионы и низкомолекулярные метаболиты (менее 2 кДа) между цитозолями двух соседних клеток. Щелевые контакты состоят из белков высоко гомологичного семейства коннексинов (connexins, Cxs). Коннексины являются коротко живущими белками, обновляющимися в течение нескольких часов (Segretain et al, 2004). Коннексины также характеризуются разнообразными белковыми взаимодействиями с компонентами цитоскелета (микротрубочками, актиновыми микрофиламентами, актин-связывающими белками), адгезионных контактов (кадгеринами, альфа- и бета-катенинами) и плотных контактов (клаудинами, окклюдином, ZO) (Dbouk et al., 2009; Chakraborty et al., 2010). Данных об участии коннексинов в реакциях работах иммунитета недостаточно, хотя В некоторых показано, что провопалительные медиаторы способны регулировать уровень коннексинов в кишечнике (Abed et al., 2014; Castellano et al., 2014).

В апикальной части примыкающих друг к другу энтероцитов располагаются плотные контакты, регулирующие межклеточный транспорт воды, ионов и мелких гидрофильных веществ. Плотные контакты образуют супрамолекулярный мультифункциональный комплекс, состояший ИЗ нескольких типов трансмембранных белков, которые взаимодействуют друг с другом, а также с цитоскелетом. Плотные контакты осуществляют механическое соединение клеток эпителия, его функциональную поляризацию, а также выполняют роль регуляторов межклеточного транспорта (Markov et al., 2017).

1.2. Комплекс плотных контактов

были идентифицированы Впервые плотные контакты с помощью трансмиссионной электронной микроскопии тонких срезов в 60-е годы ХХ века как структуры, с помощью которых эпителиальные клетки разных органов, в том числе тонкой кишки, были тесно соединены друг с другом (Farquhar et al., 1963). В начале 1970-x годов электронная микроскопия, комбинированная с методом замораживания, показала, что плотные контакты представляют собой пояски вокруг клеток, в которых мембранные компоненты комплексов полимеризуются, выстраиваясь линейно (Claude et al., 1973). Диаметр нитей комплекса плотных контактов, визуализированных с помощью электронной микроскопии после проведения замораживания-скалывания, составлял приблизительно 10 нм. С этого

составе момента стало очевидным, ЧТО тяжи В плотных контактов низкопроницаемых эпителиев создают парацеллюлярный барьер. В то же время электрофизиологические исследования показали, что трансэпителиальное сопротивление, которое отражает барьерные свойства ткани, коррелировало с плотностью наблюдаемых плотных контактов (Powell et al., 1981).

Ультраструктура плотных контактов долгое время вызывала споры; в одной работе была даже предположена липидная природа комплексов (Kachar et al., 1982). Нерастворимость комплексов плотных контактов затрудняла изучение его белковых компонентов. По иронии, прочные взаимодействия компонентов внутри комплекса позволили выделить плотные контакты целиком и при этом сохранить их морфологическую структуру (Tsukita et al., 1989); изоляция комплекса плотных контактов была прорывом, позволившим идентифицировать его белковые компоненты. Первым описанным трансмембранным белком плотных контактов был окклюдин (Furuse et al., 1993); это открытие был названо «святым Граалем» в области исследований межклеточных взаимодействий (Gumbiner et al., 1993). Однако позже было обнаружено, что окклюдин сам по себе не образует типичных тяжей плотных контактов в слоях эпителиальных клеток (Furuse et al., 1998) и что мыши с нокаутом окклюдина выживают, хотя и с многочисленными аномалиями в различных органах (Saitou et al., 2000).

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.

Основную роль в формировании и поддержании барьерных свойств эпителия отводят белкам семейства клаудина – семейству трансмембранных белков плотных контактов с четырьмя доменами (Günzel, Fromm, 2012; Марков, 2013). Количество белков в этом семействе неодинаково у разных организмов: 27 клаудинов описано у мышей и человека (Mineta et al., 2011), до 56 у рыб и земноводных (Loh et al., 2004). Несмотря на то, что клаудины были обнаружены позднее Zonula occludens -1 и окклюдина, сегодня клаудины считаются формообразующими белками плотных

контактов, регулирующими параклеточную проницаемость. Их способность снижать парацеллюлярный транспорт отражена в названии семейства: латинское слово «*claudere*» означает «запирать, закрывать».

В состав всех белков семейства клаудина входят четыре трансмембранных домена, состоящие из альфа-спиралей, и два внеклеточных сегмента ECL1 и ECL2, которые образуют бета-складчатый слой из пяти бета-цепей (b1-b5) вблизи от (Suzuki al., 2014). клеточной поверхности et Молекулярная структура трансмембранных доменов клаудинов консервативна, в то время как внеклеточные участки ECL1 и ECL2 разнообразны и обеспечивают специфику роли отдельных представителей семейства в регуляции парацеллюлярного барьера и образовании пор. Большинство клаудинов обладают С-концевыми внеклеточными PDZ-сайтами, посредством которых реализуется взаимодействие с цитоскелетом клетки через адаптерные белки (Stiffler et al., 2007). Кроме того, внеклеточный С-конец клаудинов содержит сайты для фосфорилирования, за счет которого регулируется их функционирование, и, как следствие, свойства всего комплекса плотных контактов (González-Mariscal et al.. 2008). Необходимо отметить, что процесс фосфорилирования в одних случаях необходим для миграции клаудинов и встраивания в комплекс, в то время как фосфорилирование других представителей семейства этот процесс, напротив, предотвращает (Ikari et al., 2006).

Показано, что в плотных контактах имеют место как цис-взаимодействия клаудинов одной клетки, так и транс-взаимодействия с клаудинами соседней клетки. Второй внеклеточный домен клаудинов ECL2, образующий бета-складчатый слой и стабилизирующийся за счет консенсусного мотива W–LW–C–C в составе ECL1, является поверхностью для межклеточного транс-взаимодействия (Daugherty et al., 2007). При этом между двумя разными клетками клаудины способны образовывать как гомодимеры (клаудин-1 — клаудин-1), так и гетеродимеры (клаудин-1 — клаудин-3). Транс-взаимодействия «голова-к-голове» между клаудинами соседних клеток непосредственно обеспечивают соединение клеток и формирование парацеллюлярного барьера. Гидрофобные цис-взаимодействия клаудинов одной клетки осуществляются между внеклеточной альфа-спиралью (extra-cellular helix, ECH) и карманом в составе апикальной части трансмембранного домена 3 (transmembrane region 3, TM3) находящегося рядом клаудина (Tsukita et al., 2019).

Вступать в цис-взаимодействие способны только определенные типы клаудинов, например, клаудин-2, -3 и -5 (Coyne et al., 2003). Цис-взаимодействия между клаудинами обеспечивают стягивание и сложную пространственную укладку комплекса молекул в составе плотных контактов. Разнообразие взаимодействий между клаудинами может объяснять различную проницаемость эпителиев в тканях разных органов, а также в пределах одного и того же органа.

Сложная мозаика клаудинов лежит в основе концепции крупных функциональных единиц плотных контактов – кластеров клаудинов, где каждый из них вносит специфичный вклад в проницаемость барьера (Markov et al., 2015). Так, клаудины разделяют на снижающие проницаемость эпителия (клаудин-1, -3, -4, -5, -6, -8, -12, -18 и -19), и клаудины, которые способствуют повышению парацеллюлярной проницаемости (клаудин-2, -10 и -15) (Milatz et al., 2010; Günzel, Yu, 2013). Как в *in vitro*, так и в *in vivo* экспериментах показано, что клаудин-2, -10b, -15, -16 участвуют в формировании каналов, селективных в отношении катионов, в то время как клаудин-10a и – 17 образуют анион-селективные каналы (Hou et al., 2005; Van Itallie et al., 2006; Yu et al., 2009; Tamura et al., 2011; Tanaka et al., 2016). Разнообразие функционального вклада обуславливается вариабельностью внеклеточных участков ECL1 и ECL2 и, как следствие, особенностями цис- и трансвзаимодействий каждого клаудина. Некоторые белки семейства могут способствовать как снижению проницаемости, так и увеличению, в зависимости от условий. Так, клаудин-7 главным образом принимает участие в укреплении межклеточного барьера, но в экспериментах с культурой эпителиальных клеток клаудин-7 формировал межклеточный канал для ионов хлора (Alexandre et al., 2005; 2007), что демонстрирует противоречивый вклад некоторых белков плотных контактов в функционирование барьера.

О роли в регуляции проницаемости тканевого барьера в первую очередь стало известно для клаудина-1. В экспериментах на линии клеток печени MDCK, трансфецированных вектором, содержащим клаудин-1, кратно увеличивалось трансэпителиальное сопротивление и снижалась межклеточная проницаемость для флуоресцентно-меченых макромолекул весом как 4 кДа, так и 40 кДа (Inai et al., 1999). В нокаутной модели мышей потеря клаудина-1 приводила к постнатальной гибели животных в связи с тяжелым обезвоживанием (Furuse et al., 2002).

Клаудин-2 формирует парацеллюлярный канал для воды (Rosenthal et al., 2010). Пора канала имеет диаметр 2.8 Å и характеризуется также селективной проницаемостью для малых катионов: ионов лития, натрия и калия (Amasheh et al., 2002; Yu et al., 2009; Rosenthal et al., 2010). Экспрессия клаудина-2 подвержена значительным изменениям в патогенных условиях: в ходе канцерогенеза, развития инфекционных заболеваний, при воспалении (Günzel, Fromm, 2012). В ходе развития воспаления кишечника, увеличение уровня клаудина-2 сопровождается снижением и/или перераспределением «уплотняющих» клаудинов, например, клаудина-1, -3, -4, -5 и/или -8. Эти изменения, вместе с наблюдаемой одновременно интенсификацией апоптоза эпителиальных клеток, приводят к дисфункции кишечного барьера и повышению проницаемости эпителия для ионов и воды, развитию диареи (Prasad et al., 2005; Zeissig et al., 2007; Amasheh et al., 2009). Сконцевой участок содержит PDZ-связывающий мотив, с помощью которого клаудин-2 вступает во взаимодействие со скаффолд-белками MAGUK (membraneassociated guanylate kinases), ZO-1, -2, -3 (Itoh et al., 1999; Luettig et al., 2015). Известно о способности клаудина-2 к транс-взаимодействию с клаудином-2 (гомодимерное), а также клаудином-3 (гетеродимерное) соседней клетки, но не с клаудином-1 (Furuse et al., 1999). С помощью атомно-силовой микроскопии было показано, что транс-взаимодействия клаудина-2 опосредованы установлением связи между ECL1-ECL1 доменами, но не ECL2-ECL2 или ECL1-ECL2 (Lim et al., 2008).

Клаудин-3, ранее имевший название RVP1 (rat ventral prostate protein 1), был известен как функциональный рецептор энтеротоксина *Clostridium perfringens* (Katahira et al., 1997; Milatz et al., 2010). Многочисленные исследования демонстрируют «уплотняющую» функцию клаудина-3 в эпителиях различного типа (Rahner et al., 2001; Kiuchi-Saishin et al., 2002; Coyne et al., 2003; Hou et al., 2006; Markov et al., 2010). Клаудин-3 препятствует движению ионов и крупных незаряженных молекул, но не осмотическому транспорту воды (Milatz et al., 2010). Кроме того, роль клаудина-3 в поддержании барьера зависит от экспрессии клаудина-2. При подавлении функции клаудина-2 барьерная функция клаудина-3 выражена неспецифично в отношении положительно и отрицательно заряженных ионов, однако в системах с повышенной экспрессией клаудина-2 клаудина-3 сильнее

снижает проницаемость в отношении катионов по сравнению с анионами (Milatz et al., 2010).

Клаудин-4 чаще относят к группе «уплотняющих» клаудинов, хотя данные о его влиянии на проницаемость эпителиев противоречивы. Сверхэкспрессия MDCK клаудина-4 В линии клеток сопровождалась увеличением трансэпителиального сопротивления и снижением проницаемости для ионов натрия (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). Посттрансляционные модификации клаудина-4, а именно, фосфорилирование, может лежать в основе двойственности роли этого белка: проницаемость для анионов коррелировала с фосфорилированием клаудина-4 в клетках линии собирательной трубки крысы (Le Moellic et al., 2005). Клаудин-4 колокализуется с клаудином-3 в различных эпителиальных тканях человека и мыши. Эти два белка семейства характеризуются схожим строением С-концевого участка, и с помощью ECL2 домена связываются с энтеротоксином Clostridium perfringens (Sonoda et al., 1999; Eckelhoefer et al., 2011). Другая неканоническая функция клаудина-4 связана с регуляцией апоптоза: снижение активности или полная потеря клаудина-4 приводили к активации проапоптотической каспазы-3 и снижали интенсивность миграции раковых клеток на 50% (Hicks et al., 2016).

Так же, как и белки семейства клаудина, семейство TAMP (tight-junction associated Marvel protein – белки Марвел, ассоциированные с плотными контактами) включает интегральные белки плотных контактов с четырьмя трансмембранными доменами. К этому семейству относят окклюдин, впервые обнаруженный среди прочих белков плотных контактов, И трицеллюлин, преимущественно расположенный в области трицеллюлярных комплексов, то есть объединяющих три смежные клетки. Роль окклюдина в организации плотных контактов противоречива: нокаутные по окклюдину мыши выживают и не демонстрируют нарушений барьерной функции эпидермального, дыхательного, кишечного эпителия или эпителия почки (Saitou et al., 2000). При этом окклюдин, очевидно, принимает участие в организации комплексов плотных контактов: супрессия окклюдина приводила к снижению уровней клаудина-1 и -7 и повышению уровня клаудина-3 и

-4 (Yu et al., 2005). Вероятно, противоречивая роль окклюдина может объясняться известным явлением избыточности замещения, при которой недостаток окклюдина может приводить к его возмещению за счет других компонентов комплекса (Raleigh et al., 2010).

Еще один представитель ТАМР семейства, трицеллюлин, регулирует, главным образом, проницаемость и связь с актомиозиновым цитоскелетом для контактов между тремя клетками (так называемые трицеллюлярные контакты, tricellular tight junctions, tTJ) (Ikenouchi et al., 2005; Cho et al., 2022). Ранее показано, что нокдаун по трицеллюлину или повреждающие мутации в этом белке приводят к нарушению сборки комплексов плотных контактов (Ikenouchi et al., 2005). Повидимому, трицеллюлин непосредственно формирует уплотняющий элемент трицеллюлярных плотных контактов, способствуя уменьшению диаметра пустого пространства между тремя соседними клетками, однако структура этих комплексов до конца не изучена (Cho et al., 2022).

Таким образом, представители семейств белков клаудина и ТАМР-семейства формируют сложные цис- и транс-взаимодействия, лежащие в основе регуляции проницаемости барьерных тканей плотными контактами. Комплекс белков плотных контактов является динамической структурой, в которой уровень и локализация разных представителей семейства белка клаудина может изменяться под влиянием различных факторов. Кроме того, мозаика белков плотных контактов варьирует в зависимости от типа эпителия и соотношения барьерной и транспортной функций в конкретной ткани.

1.3. Сегмент-специфичность барьерных функций, проницаемости и молекулярного состава плотных контактов в разных отделах кишечника

Межклеточная и внутриклеточная проницаемость, а также степень выраженности барьерных функций неодинакова на протяжении проксимальнодистальной оси кишечника и совпадает с физиологической ролью каждого сегмента. Барьерные и транспортные функции, а также проницаемость различных сегментов кишки для молекулярных агентов различной массы и заряда оценивают с помощью *ex vivo* экспериментов в камере Уссинга (Blazer-Yost et al., 2022).

Классическая установка камеры Уссинга состоит из двух цилиндрических половин, соединенных отверстием, между которыми монтируется фрагмент ткани. Слизистая сторона кишки оказывается обособленной от базолатеральной стороны (рис.1) (Clarke et al., 2009). Во время эксперимента каждая половина камеры заполняется равным количеством раствора Рингера и подключается к системе перфузии для обеспечения оксигенации и перемешивания жидкости. Два электрода напряжения обычно вводят близко к ткани для измерения трансэпителиальной разности потенциалов, возникающей из-за активного транспорта ионов через ткань. Два дополнительных токовых электрода подают импульсы тока. Полный ток, необходимый для компенсации спонтанной разности потенциалов, называется током «короткого замыкания» и рассматривается как сумма всех ионных токов через эпителий, отражающая интенсивность транспортных процессов. И наоборот, трансэпителиального электрического сопротивления (T₃C), измерения отражающего барьерные свойства ткани, выполняются путем отслеживания отклонений напряжения в ответ на установленные импульсы тока и рассчитываются на основе закона Ома.

В большинстве экспериментов для оценки проницаемости кишки молекулымаркеры добавляются в апикальную половину камеры Уссинга, после чего с течением времени берутся базолатеральные образцы раствора для измерения концентрации прошедшего через ткань образца. Гидрофильное маркерное соединение флуоресцеин натрия, который пассивно транспортируется через парацеллюлярный путь, зачастую используется в качестве флуоресцентного зонда для наблюдения за проницаемостью всех видов физиологических барьеров или пассивного парацеллюлярного транспорта плотных соединений (Fu et al., 2015; Guo et al., 2019). Количество проникающего флуоресцеина натрия определяется проницаемостью ткани, вмонтированной в камеру Уссинга, что, в свою очередь, отражает степень целостности барьера. Важно признать, что парацеллюлярный поток малых молекул-маркеров часто будет коррелировать с аналогичными изменениями ТЭС, но эти параметры не обязательно связаны, поскольку представляют разные характеристики барьера (не ионный поток в сравнении с ионной проводимостью) (Vancamelbeke, Vermeire, 2017).



Рисунок 1. Схема камеры Уссинга для изучения барьерной функции и проницаемости кишечного эпителия. По: Blazer-Yost et al., 2022.

В исследованиях фрагментов кишки крысы в камере Уссинга был показан сегмент-специфичный градиент ТЭС в разных отделах (Markov et al., 2010). Самое высокое значение ТЭС было зафиксировано в толстой кишке, более низкое значение в подвздошной кишке и самое низкое в тощей кишке. При этом с помощью техники импедансной спектроскопии было показано, что сопротивление эпителия слизистой имело наибольший вклад (до 90%) в общее сопротивление фрагмента толстой кишки, причем с выраженным повышением в проксимальных отделах. Среди сегментов тонкой кишки вклад сопротивления эпителия был самым существенным в двенадцатиперстной кишке и самым низким в подвздошной, что отражает градиент ТЭС в тонкой кишке в проксимально-дистальном направлении (Markov et al., 2010). Повышенное трансэпителиальное сопротивление в двенадцатиперстной кишке защищает внутреннюю среду от кислого pH и эмульгирующих жиры кислых солей.

Сегмент-специфичность распределения белков плотных контактов имеет место даже в пределах одной системы органов, например, для эпителия почки или кишечника (Amasheh et al., 2011; Günzel, Yu, 2013; Koziel et al., 2021). Комбинация и пропорция белков плотных контактов определяет барьерную и пропускную способность эпителиев, в связи с чем паттерн их распределения различается в сегментах кишки и совпадает со степенью выраженности барьерных функций (табл. 1). Толстая кишка демонстрирует самую высокую экспрессию «уплотняющих» клаудинов в поверхностном эпителии, тогда как тощая и подвздошная кишка могут характеризоваться более низкой экспрессией этих белков в слизистой в сочетании с более выраженной экспрессией клаудинов, опосредующих парацеллюлярную проницаемость.

Сегмент-специфичный характер распределения клаудинов, снижающих проницаемость кишечного эпителия. Уровень экспрессии клаудина-1, способность которого снижать проницаемость эпителия была доказана в нокаутных экспериментах на мышах и клеточных линиях (Furuse et al. 2002; Weng et al. 2005), коррелировал с градиентом барьерных функций в разных отделах кишечника. Максимальный уровень обнаруживали в толстой кишке крысы, затем по убыванию в тощей, подвздошной и двенадцатиперстной (Markov et al., 2010). Наиболее выраженная экспрессия клаудина-3, который также характеризуется уплотняющей

Таблица 1. Экспрессия клаудинов плотных контактов в сегментах кишечника.

* различные сегменты толстой кишки

Сегмент	Клаудины плотных контактов			Ссылки	
	Человек	Мышь	Крыса	Свинья	
Двенадцати-	1, 2, 3, 4,	1, 2, 3, 4,	1, 2, 3, 4,	1, 3, 4, 5	Holmes et al., 2006;
перстная	7, 8, 12,	5, 7, 8, 9,	5, 7, 8, 12		Fujita et al, 2006;
кишка	15, 18	10, 11,			Markov et al., 2010;
		12, 14,			Lameris et al., 2013;
		15, 18			Wu et al., 2020;
					Deluco et al., 2021;
					Zong et al., 2019;
					Rahner et al., 2001
Подвздошная	2		1, 2, 3, 5,	1, 3, 4, 5	Holmes et al., 2006;
кишка		1, 2, 3, 4,	7,12		Fujita et al, 2006;
		5, 7, 8, 9, 10, 11,			Markov et al., 2010;
		12, 13,			Lameris et al., 2013;
		14, 15, 18			Lee et al., 2018; Wu et
					al., 2020; Deluco et
					al., 2021; Zong et al.,
					2019
Толстая		1, 2, 3, 4,	1, 2, 3, 5,	1, 2, 3,	Holmes et al., 2006;
кишка	1, 2, 3, 4,	5, 7, 8, 9,	7, 8, 12	5, 7, 8,	Fujita et al, 2006;
	5, 7, 8, 12,	10, 11,		12	Markov et al., 2010;
	15, 10	12, 14, 15			Lee et al., 2018; Yong
					et al., 2021; Rahner et
					al., 2001; Bürgel et al.
					2002; Zeissig et al.
					2007
Слепая	2, 3, 4, 7,	1, 2, 3, 4,	1, 2, 3, 5,	1, 3, 4, 5	Holmes et al., 2006;
кишка*	8, 12, 15,	5, 7, 8, 9,	7, 8, 12		
	18	10, 11,			

		12 12			
		12, 15,			
		14, 15			
Восходящая		1, 2, 3, 4,	1, 2, 3, 4,	1,4	Lameris et al., 2013;
ободочная*		5, 7, 8, 9,	5, 7, 8, 9,		
		10, 11,	12		
		12, 14, 15			
Поперечная					Lameris et al., 2013
ободочная*	2, 3, 4, 7, 8, 12, 15, 18				
Нисхоляшая	2, 3, 4, 7,				Lameris et al., 2013
оболонная*	8 12 15				
ооодочная	0, 12, 13,				
	18				
Сигмовидная*	2, 3, 4, 7,				Lameris et al., 2013
	8, 12, 15,				
	18				
Прямая*			3		Zeissig et al., 2007;
	1, 2, 3, 4,				Lioni et al., 2007;
	7, 8, 12, 15, 18				Lameris et al., 2013

функцией, обнаруживалась в толстой кишке крыс. Крайне низкий уровень клаудина-3 идентифицировали в тощей кишке крыс, несколько выше в двенадцатиперстной кишке. Напротив, в исследовании на мышах, отличий между этими сегментами не было выявлено, однако в толстой кишке экспрессия клаудина-3 также была повышена (Fujita et al., 2006).

Подобно клаудину-1 и -3, максимальная экспрессия клаудина-4 была обнаружена в толстой кишке, тогда как в тощей кишке крыс клаудин-4 не был обнаружен. Напротив, сообщалось, что экспрессия клаудина-4 в кишечнике мышей снижается вдоль проксимально-дистальной оси (Fujita et al. 2008). Клаудин-4, как и клаудин-3, поддерживает кишечный барьер, однако проницаемость кишечного эпителия может снижаться при связывании с этими белками энтеротоксина *Clostridium perfringens*. Относительно более высокая экспрессия клаудина-3 и -4 в двенадцатиперстной кишке соответствует более высокому вкладу сопротивления именно эпителиального слоя в общее значение сопротивления по сравнению с тощей и подвздошной кишкой. У человека максимальная экспрессия уплотняющих клаудинов-3 и -4 также относится к толстой кишке (Lameris et al., 2013).

Анализ характера экспрессии клаудина-5 показал, что этот белок локализован во всех рассматриваемых сегментах крысы и в основном экспрессируется в толстой кишке. Экспрессия клаудина-5 в тонком кишечнике аналогична экспрессии клаудина-3: в тощей кишке уровень этого белка был ниже, чем в двенадцатиперстной и подвздошной кишке.

Экспрессия клаудина-8 в кишечнике мышей и человека увеличивается вдоль толстой кишки по направлению к прямой кишке, в отличие от клаудина-15, пик экспрессии которого приходится на двенадцатиперстную кишку и тощую кишку (Fujita et al, 2006; Holmes et al., 2006; Lameris et al., 2013).

Сегмент-специфичный характер распределения клаудинов, повышающих проницаемость кишечного эпителия. Повышающий проницаемость клаудин-2 преимущественно экспрессируется в тонкой кишке. Распределение экспрессии клаудина-2 у крыс находится в обратном соответствии с трансэпителиальным сопротивлением: высокий уровень белка наблюдали в двенадцатиперстной, тощей и подвздошной кишке по сравнению с толстой кишкой. Более того, повышение экспрессии клаудина-2, по-видимому в значительной мере определяет

кишечного эпителия, поскольку воспалительные проницаемость процессы кишечника сопровождаются появлением клаудина-2 на поверхности эпителия кишки (Zeissig et al., 2007; Amasheh et al., 2009). Клаудин-7, который принимает участие в формировании канала для ионов хлора, в тонкой кишке коэкспрессировался с клаудином-2, и имел максимальный уровень в подвздошной кишке крыс, в то время как в тонкой кишке мыши ранее не был обнаружен градиент клаудина-7 (Fujita et al., 2006). Клаудин-12 также принадлежит к группе белков, увеличивающих проницаемость барьера за счет формирования поры для ионов кальция (Fujita et al., 2008). Так же, как и другие клаудины со схожей функцией, клаудин-12 локализовался преимущественно в тонкой кишке крыс, но в отличие от клаудина-2 И -7, максимум экспрессии клаудина-12 приходился на двенадцатиперстную кишку (Markov et al., 2010). В более раннем исследовании распределения клаудинов в кишечнике мыши было показано, что пик экспрессии клаудина-12 приходится на подвздошную кишку (Fujita et al., 2006). В целом стоит отметить, что характер распределения клаудинов плотных контактов характеризуется выраженной видоспецифичностью. Так, клаудин-7 у крыс и мышей обнаруживали в тощей и слепой кишке (Holmes et al., 2006; Markov et al., 2010), тогда как у людей он наблюдается в толстой и прямой кишке (Lameris et al., 2013).

Таким образом, разные сегменты кишечника млекопитающих характеризуются неодинаковой мозаикой белков плотных контактов в зависимости от выраженности барьерных и транспортных функций в соответствующей ткани. В этой связи патологическое воздействие может вызывать неодинаковое перераспределение белков комплексов в разных отделах кишки, что должно учитываться при сегмент-специфичном подходе для терапии этих состояний.

1.4. Воздействие ионизирующего излучения на ЖКТ

Лучевое поражение кишки может развиться как в ходе облучения всего тела в результате радиационных инцидентов или аварий, так и в течение курса радиотерапии, который пациент получает в связи с наличием злокачественной опухоли желудочно-кишечной, урогенитальной или гинекологической природы. Приблизительно 70% всех онкологических больных получают лучевую терапию во время курса лечения, при этом ответ именно на лучевую терапию играет

центральную роль в 25% всех случаев ремиссии (DeVita, Hellman, 2005; Shadad et al., 2013). Лучевая терапия является экономически эффективным методом лечения, на которую приходится всего 5% от общих расходов на лечение рака (Ringborg et al., 2003). Эта оценка увеличилась за последнее десятилетие в связи с широким использованием современных технологических инноваций в моделировании, определении границ, расчете дозы и проведении лучевой терапии (Van de Werf et al., 2012). Лучевое поражение желудочно-кишечного тракта является серьезной проблемой в области применения радиотерапии по двум основным причинам. Вопервых, оно вызывает состояние, связанное со значительным снижением качества жизни пациентов (Bacon et al., 2001, 2002) и последующим экономическим бременем (Sher et al., 2010). Во-вторых, развитие лучевой травмы кишки лимитирует дозу излучения, которая может быть использована для борьбы с опухолью, так как токсичные эффекты, связанные с лучевой терапией, часто ограничивают переносимость для пациентов и напрямую влияют на выбор терапии.

Совокупное воздействие радиации на ЖКТ носит название острого радиационного желудочно-кишечного синдрома (Gastro-Intestinal Acute Radiation Syndrome, GIARS). Ряд авторов определяет GIARS как состояние, которое развивается при облучении в дозах 6-15 Гр (Macià I Garau et al., 2011), в других источниках указывается, что поражение ЖКТ играет ведущую роль в клинической картине острой лучевой болезни (ОЛБ) при облучении в дозах более 10 Гр (Костеша, Даренская, 1990; Гребенюк и др., 2015; Shukla et al., 2016). Выраженность признаков и степень развития GIARS варьируют между биологическими видами и зависят от мощности дозы и разновидности ионизирующего излучения. Так, полулетальная доза (ЛД50) для крыс породы Вистар составляет 6.6 Гр при воздействии рентгеновского излучения (Srinivas et al., 2015), для мышей 4-6 Гр (Исамов, Исамов, 2010), для человека 3.4 Гр (Levin et al., 1992). В течение первых нескольких суток после облучения у мышей и крыс не наблюдается изменений во внешнем виде, но отмечается потеря массы тела. На третьи сутки появляется взъерошенность, сонливость, вялость, диарея профузного и геморрагического характера (Костеша, Даренская, 1990). Затем может наступать кратковременный (2-3 суток) период улучшения общего состояния, но симптомы ОЛБ полностью не уходят. На более поздних стадиях в связи с абляцией пролиферации клеток крипт, нарушением

восстановления энтероцитов и последующим разрушением кишечного барьера бактерии из просвета кишки проникают в системный кровоток; летальный исход наступает вследствие обезвоживания, эндотоксемии и сепсиса (Dubois et al., 1988; Damman et al., 2009; Harb et al., 2014; Wang et al., 2015). Симптомы кишечного синдрома ОЛБ сопровождаются также критическим снижением уровня гранулоцитов на начальных этапах и опустошением костного мозга на поздних этапах GIARS. При воздействии в дозе 10 Гр крысы породы Вистар погибали в течение 7-10 дней после облучения с тяжелыми симптомами: существенная потеря веса, диарея, отечность (Srinivas et al., 2015). Таким образом, GIARS представляет собой синдром острой лучевой болезни, при котором клиническая картина ОЛБ и последующий летальный исход связаны с лучевой травмой кишечника.

Основной молекулярной мишенью поражающего действия ионизирующего излучения является ДНК, в составе которой формируются различные повреждения: нарушение структуры оснований, появление апуриновых/апиримидиновых сайтов, одноцепочечные (single-strand breaks, SSB) и двуцепочечные разрывы (double-strand breaks, DSB), кросс-сшивки между ДНК и белком (Ward, 1988; Nakano et al., 2022). Одним из последствий повреждения наследственного материала является остановка жизненного цикла активно пролиферирующих клеток и последующий апоптоз. В тонкой кишке наиболее чувствительными к излучению являются клоногенные клетки, находящиеся на дне крипт. Из активно пролиферирующего компартмента крипт эпителиоциты постепенно мигрируют в сторону верхушки ворсинки в течение 3-5 дней у грызунов (Potten, 1990). По мере продвижения в сторону верхушки ворсинки эпителиоциты дифференцируются, приобретая необходимые молекулярные комплексы для абсорбции нутриентов и транспорта электролитов, устанавливая специфические межклеточные контакты (Traber et al., 1992). В результате фрагментации ДНК в эпителии кишки происходит арест пролиферации делящихся клеток на дне крипт, находящихся на стадии G2 или митоза, с последующей гибелью (Poindexter et al., 2015; Jalili-Firoozinezhad et al., 2018). Дифференцированные эпителиоциты, будучи более резистентными к повреждению ДНК, после облучения продолжают движение к верхушкам ворсинок и постепенно слущиваются в просвет кишки. Вследствие этого эпителиальная выстилка тонкой кишки при отсутствии регенерации за счет клеточного деления на дне крипт, быстро

исчезает, ворсинки оголяются и утолщаются. Наблюдается инфильтрация иммунными клетками на поверхности кишечного эпителия, в *lamina propria*, в подслизистой основе; заметны эдемы, геморрагические процессы (Kiang et al., 2017). Может происходить закупорка сосудов подслизистой основы кишечного эпителия (Robbins et al., 2004, Riley et al., 2009). В тонкой кишке наблюдается слияние и утолщение ворсинок, уменьшение их количества, снижения числа или полное исчезновение крипт (Elliott et al., 2014; El-Ghazaly et al., 2015).

Указанные морфологические изменения развитии GIARS при сопровождаются функциональными нарушениями кишечного барьера: растет проницаемость слизистой, изменяется характер транспорта электролитов между просветом и внутренней средой организма, снижается барьерная функция кишечного эпителия. Воздействие ионизирующего излучения на транспортные и барьерные функции кишечного эпителия изучено в ряде работ с помощью измерения электрофизиологических характеристик кишки в камере Уссинга. Так, в работе Gunter-Smith и соавт. было показано, что воздействие ионизирующего излучения стимулирует транспортные процессы между серозной и мукозной стороной тонкой кишки. При воздействии излучения в дозах 5, 7.5, 10 и 12 Гр ток «короткого замыкания» в камере Уссинга дозо-зависимо повышался в подвздошной кишке кролика (Gunter-Smith et al., 1986). Известно, что облучение приводило к усилению секреции анионов хлора в просвет кишки и снижению секреции бикарбонатов за счет редукции экспрессии котранспортеров натрия и бикарбонатов вдоль ворсинки тонкой кишки (Zhang et al., 2011; Gunter-Smith et al., 1986). Снижение барьерной функции подвздошной кишки при тотальном облучении наблюдали у мышей в работе Gupta и соавт.: воздействие в дозах от 3 Гр вызывало повышение проводимости и межклеточной проницаемости эпителия уже через два дня после облучения (Gupta et al., 2020).

Известно, что радиация сегмент-специфично воздействует на ЖКТ; толстая кишка считается более радиоустойчивой по сравнению с толстой кишкой. Это связывают с интенсивным протеканием спонтанного апоптоза в клетках, локализованных на дне крипт тонкой кишки (Potten, Loeffler, 1990, 1997). Наиболее частые события спонтанной клеточной гибели ассоциируют со стволовыми клетками сразу над клетками Паннета на дне крипт (Potten, Grant, 1998). В толстой

кишке интенсивность спонтанного апоптоза в 10 раз ниже и клеточная гибель не ассоциирована с позициями на дне крипт, которые занимают стволовые клетки. Сниженная интенсивность спонтанной клеточной гибели, ассоциированной со стволовыми клетками крипт в области толстой кишки связывают с повышенной экспрессией анти-апоптотического белка Bcl-2, наблюдаемой в этой зоне в толстой кишке мыши и человека (Merritt et al., 1995). Воздействие радиации, так же, как и другие цитотоксические агенты и мутагены, вызывает значительное повышение уровня спонтанного апоптоза в криптах тонкой, но не толстой кишки, с максимумом через 3-6 ч после облучения (Potten, Grant, 1998). Одновременно, воздействие радиации приводит к повреждению генетического материала с последующим повышением уровня р53 и остановкой клеточного цикла. Такой арест пролиферации необходим для осуществления репарации повреждений ДНК либо осуществления клеточной гибели. Однако при воздействии облучения интенсивный сигнал от апоптотических клеток на дне крипт не колокализовался с сигналом р53, что указывает на то, что экспрессирующие p53 клетки, по-видимому, представляют собой другую популяцию менее клоногенных и, как следствие, более устойчивых к облучению стволовых клеток. В толстой кишке Bcl-2 сдерживает как спонтанный апоптоз, так и вызванный повреждением ДНК в норме и в ответ на цитотоксическое воздействие. То есть гомеостатический механизм, ограничивающий пролиферацию стволовых клеток с одной стороны и элиминирующий поврежденные клетки с другой, расслаблен в толстой кишке (Potten, Grant, 1998). Эта гипотеза объясняет также сегмент-специфичность формирования злокачественных опухолей в ЖКТ: злокачественные образования чаще возникают в толстом кишечнике, чем в тонком, по причине поддержания выживаемости клеток в условиях повреждения ДНК за счет высокой экспрессии Bcl-2. Нокаут Blc-2 у мышей приводил к значительному повышению уровня спонтанного и спровоцированного облучением апоптоза в толстой, но не в тонкой кишке (Merritt et al., 1995). Ингибиторы белков семейства Bcl-2 используются для повышения чувствительности клеток к ионизирующему излучению (Ritter et al., 2021).

Апоптоз в нормальной ткани тонкого кишечника осуществляется достаточно интенсивно: 1-10% стволовых клеток крипт погибают в единицу времени на дне крипты у здоровой мыши и человека (Potten, 1977; Potten, Grant, 1998). При
облучении в дозе 8 Гр через 4.5 ч у мышей наблюдалось усиление апоптоза до максимальных значений и одновременное снижение количества митотических фигур среди эпителиоцитов крипты в связи с блокировкой пролиферативного цикла на стадии G2 (Potten, Grant, 1998). Через 24 ч запускается регенеративная пролиферация в области крипты (пик на позиции номер 5, если считать от середины дна), а интенсивность апоптоза снижается. Через 48 ч после облучения и в дальнейшем интенсивность апоптоза снижается еще сильнее, а основная митотическая активность смещается от центра дна крипты выше по оси «криптаворсинка» (позиция 9 через 60 ч, позиция 11 через 65 ч и т.д.) (Potten, Grant, 1998).

Плотные контакты являются высоко чувствительной структурой, которая подвержена изменениям в ходе патогенеза различных заболеваний (Markov et al., 2014, 2019). Ряд авторов исследует молекулярные механизмы инициируемой радиацией дезинтеграции кишечного эпителия в свете нарушения межклеточных контактов. Так, известно, что вызванное облучением снижение экспрессии белка плотных контактов Zonula Occludens-1 (ZO-1) в культуре эпителиоцитов и белка клеточной адгезии VE-кадгерина в эндотелиоцитах приводило к нарушению монослоя клеток и формированию заметных промежутков, не содержащих клеток (Jalili-Firoozinezhad et al., 2018). В работах Shukla и соавт. было показано, что гаммаоблучение в дозе 4 Гр при посредстве продуктов свободно-радикального окисления вызывает разрыв плотных, адгезионных контактов, а также перестройку актинового цитоскелета в тонкой и толстой кишке грызунов (Shukla et al., 2016, 2020). Снижение уровня клаудина-1, -3 и -4 и повышение уровня клаудина-2 было обнаружено в подвздошной кишке крыс и мышей после абдоминального воздействия ионизирующего излучения в дозах, вызывающих развитие GIARS (Shim et al., 2015; Gupta et al., 2020). Увеличение экспрессии окклюдина было зарегистрировано в эпителии мочевого пузыря после облучения (Baradaran-Ghahfarokhi et al., 2017). Примечательно, что индуцированная сверхэкспрессия окклюдина в тонкой кишке ранее подавляла рост опухоли путем модулирования набора нескольких генов, связанных с апоптозом (Osanai et al., 2006). Возможно, в рамках индуцированной радиацией митотической катастрофы увеличение содержания окклюдина является звеном запуска апоптоза. Это также подтверждается протеомными данными, демонстрирующими общие белок-белковые взаимодействия между окклюдином и

белками, которые участвуют в апоптотическом ответе и регуляции скорости пролиферации (Fredriksson et al., 2015).

Сегмент-специфичные изменения белков плотных контактов в разных отделах кишечника мало изучены. В работе Garg и соавт. на модели приматов изучали экспрессию мРНК некоторых клаудинов в тощей, подвздошной и толстой кишке. Радиация стимулировала экспрессию клаудина-10 и -2 и понижала экспрессию клаудина-4 и Е-кадгерина во всех сегментах. Клаудин- 1 был повышен только в толстой кишке, а клаудин-7 понижен только в подвздошной (Garg et al., 2016). Тем не менее, учитывая известный градиент радиоустойчивости, наблюдаемый между тонкой и толстой кишкой млекопитающих, необходимо комплексное исследование сегмент-зависимого эффекта ионизирующего излучения на барьерные свойства кишки и его корреляции с реорганизацией плотных контактов.

1.5. Стратегии предотвращения повреждающего воздействия ионизирующего излучения: поиск радиопротекторов

В настоящее время не существует единой рекомендации для предотвращения и лечения лучевой травмы кишки (Shadad et al., 2013). Многообразие техник, применяемых для смягчения повреждающего воздействия ионизирующего излучения на кишечный эпителий, можно подразделить на технические и биологические стратегии.

Технические стратегии. К техническим стратегиям относятся разнообразные методы планирования эксперимента и лучевой терапии пациента, которые позволяют снизить поглощенную дозу в нормальных тканях кишечника, а также минимизировать степень экспозиции тонкой кишки (Bacon et al., 2002). Для этого варьируют положение пациента в ходе курса лучевой терапии (Bayley et al., 2004); вытесняют тонкую кишку из тазовой области путем растяжения мочевого пузыря и компрессии нижней части брюшной стенки (Gallagher et al., 1986); используют Bellyboard технику, при которой живот пациента, лежащего на животе, помещен в отверстие в койке и смещается вниз под действием собственного веса, в результате чего тонкая кишка оказывается ниже фокуса облучения (Shanahan et al., 1990). С целью минимизации поглощенной дозы облучения прямой кишки осуществляли

трансперинеальное введение человеческого коллагена для увеличения расстояния между предстательной железой и передней стенкой прямой кишки (Meric et al., 1994). Брахитерапия — передовой метод, при котором источник излучения имплантируется в злокачественные ткани (интерстициальная брахитерапия) или в полость в непосредственной близости от нее (внутриполостная брахитерапия), используется для снижения цитотоксичности в отношении нормальных тканей при лечении рака простаты (Peters et al., 2006; Lee et al., 2007). Использование протонной лучевой терапии позволяет эффективно снизить объем нормальных тканей, облучаемых в высоких дозах, для большинства анатомических участков, по сравнению с любой фотонной техникой (Suit et al., 2003; Sugahara et al., 2010). Хотя технические стратегии позволили достичь значительной степени защиты нормальных тканей во время лучевой терапии, их разработка затруднена в связи с экономическими затратами, а применение ограничено сложными техническими требованиями. Биологические стратегии могут предложить дополнительные перспективы в будущем. Широкий спектр фармакологических средств, пищевых добавок и диетических мер был исследован на предмет потенциальной пользы для предотвращения или сведения к минимуму тяжести повреждения тканей кишечника, вызванного воздействием ионизирующего излучения.

Биологические стратегии. В клинике широко используются тиолсодержащие соединения, такие как амифостин и цистеамин. Они обезвреживают высокореактивные свободнорадикальные соединения, образующие в эпителиоцитах при воздействии излучения и оказывающие повреждающее воздействие на ДНК, липиды и белки. Введение амифостина внутривенно перед проведением тазовой лучевой терапии у пациентов с ректальным раком снижало вероятность появления лучевого проктита (Athanassiou et al., 2003; Keefe et al., 2007). В 2002 году Американское Общество Клинических Онкологов рекомендовало использование амифостина в опубликованных документах (Schuchter et al., 2002). Однако, в 2008 году в переиздании рекомендаций упоминание об амифостине было удалено в связи с противоречивостью полученных данных об успешности его применения (Hensley et al., 2008). Некоторые другие вещества с известными антиоксидантными свойствами проходят разные этапы доклинических исследований в качестве потенциальных радиопротекторов кишечного эпителия (витамин Е, витамин С,

глутамин). Так, применение витаминов Е и С предотвращало вызванное облучением нарушение морфологии и абсорбции жидкости в тонкой и толстой кишке, а также уменьшало вероятность кровотечений, диареи и недержания у пациентов с лучевым проктитом (Mutlu-Türkoğlu et al., 2000; Empey et al., 1992; Kennedy et al., 2001).

Противовоспалительные агенты (5-аминосалициловая кислота (5-ASA) и ее каптоприл, рофекоксиб, производные: балзалазид, октеотид, энтолимод) использовались в различных клинических испытаниях для облегчения симптомов лучевого проктосигмоидита и постлучевого фиброза тонкого и толстого кишечника (Goldstein et al., 1976; Jahraus et al., 2005). Применение простагландина E2 снижало уровень апоптоза в тонкой кишке при воздействии ионизирующего излучения и способствовало выживанию клеток на дне крипт (Stenson et al., 2007). Предварительное введение CBLB502, антагониста TLR5 рецептора, приводило к повышению выживаемости мышей и макак-резус при воздействии доз, вызывающих GIARS, однако не изменяло радиочувствительности эпителиоцитов тонкой кишки (Burdelya et al., 2008). Введение глюкагон-подобного пептида-2 GLP-2 крысам предотвращало вызванное облучением укорочение ворсинок и снижение глубины крипты (Torres et al., 2007). В другой работе исследовали возможность применения в качестве протекторного агента предшественник L-цистеина NAC (N- ацетил цистеин), принимающий участие в синтезе восстановленного глутатиона (GSH). Глутатион, в свою очередь, обеспечивает нейтрализацию свободнорадикальных форм кислорода, образующихся в ходе радиационного воздействия. Было показано, что NAC снижает экспрессию проапоптотических каспаз-3 и -7 и уровень малонового диальдегида (MDA) (Mercantepe et al., 2019).

Несмотря на множество текущих доклинических и клинических исследований, не существует «золотого стандарта» протекции от лучевой травмы кишки. Преимуществами идеального радиопротекторного агента можно было бы назвать легкость доставки в клетки, отсутствие токсичности и тяжелых побочных эффектов, отсутствие влияния на противоопухолевую активность лучевой терапии и химиотерапии. В этом ключе фармакологический агент, который регулирует межклеточные контакты эпителиоцитов может быть более специфичным, нежели другие потенциальные вещества. На сегодняшний день существует небольшое количество данных об исследованиях подобных агентов. Так, ранее было показано,

что нейротензин (neurotensin) предотвращал транслокацию бактерий в кровоток, снижение количества стволовых клеток крипт и бокаловидных клеток и укорочение ворсинок в подвздошной кишке крыс после облучения (Shim et al., 2015). Авторы связывают протективный эффект нейротензина с повышением экспрессии клаудина-3 и восстановлением плотных контактов. Введение нейротензина приводило к изменению экспрессии белков плотных контактов и барьерной функции тонкой кишки при моделировании обструктивной желтухи у крыс (Assimakopoulos et al., 2005). Несмотря на наличие отдельных исследований в этой области, не обнаружено фармакологического агента, который оказывал бы протекторное действие в отношении лучевого поражения кишки путем воздействия на компоненты плотных контактов.

1.6. Функциональное взаимодействие Na,К-АТФазы и ее ингибитора уабаина с плотными контактами в норме и при патологии

Недавно было обнаружено, что важным молекулярным актором, способным регулировать функцию плотных контактов. является Na,K-АТФаза, трансмембранный переносчик натрия из клетки и калия в клетку путем гидролиза одной молекулы ATΦ (Rajasekaran, Rajasekaran, 2009; Clausen. 2017). Электрохимический градиент по обе стороны клеточной мембраны, в формировании Na,K-АТФаза, которого принимает участие необходим ДЛЯ регуляции направленного транспорта молекул через эпителиальные клетки (Matchkov, Krivoi, 2016; Cui, Xie, 2017). Исследования последних лет позволили установить, что помимо «классических» функций по переносу ионов, Na,K-ATФаза поддерживает сложные изоформ-специфичные реципрокные функциональные взаимодействия с многими белками и липидами. Некоторые данные свидетельствуют о том, что Na,K-АТФаза может играть роль в транспорте через эпителиальный барьер, регулируя структуру и проницаемость плотных контактов (Rajasekaran, Rajasekaran, 2009).

Функционирующая Na,K-ATФаза состоит из крупной каталитической α субъединицы (110 кДа) и меньшей по размеру β-субъединицы, представляющей собой гликопротеин размером 31.5 кДа. α-субъединица обеспечивает транспорт ионов, имеет десять трансмембранных доменов, содержащих сайты связывания ионов натрия на внеклеточных петлях и сайты связывания калия и АТФ на

внутриклеточных петлях (Blanco, Mercer, 1998; Mobasheri et al., 2000). β субъединица пересекает мембрану один раз; она поддерживает каталитическую активность и модулирует аффинность фермента к ионам натрия и калия. Известно, что β -субъединица также функционирует как шаперон для α -субъединицы и играет важную роль в клеточной адгезии (Liu, Askari, 2006; Liu et al., 2011; Tokhtaeva et al., 2012). Описана также небольшая трансмембранная субъединица, специфичная для некоторых тканей, которая ассоциирована с основными субъединицами и участвует в модуляции ферментативной активности (Garty, Karlish, 2006; Arystarkhova, 2016). Для α -субъединицы описано несколько изоформ: считается, что основной является α 1-изоформа, белок «домашнего хозяйства», в то время как остальные изоформы распределены ткане-специфично. Так, α 2-изоформа экспрессируется в скелетной, сердечной и гладкой мускулатуре и глиальных клетках, а α 3-изоформа представлена преимущественно в нейронах (Krivoi, 2012; Li, Langhans, 2015).

По-видимому, Na,K-АТФаза обладает сетью функциональных взаимодействий с сигнальными молекулами, формируя сложный макромолекулярный скаффолд. Так, α-субъединица образует связи с актиновым цитоскелетом, взаимодействуя с актин-связывающим белком анкирином (Nelson, Veshnock, 1987; Devarajan et al., 1994) и кофилином (Lee et al., 2001). α-субъединица также взаимодействует с белками, вовлеченными в механизм эндоцитоза, такими как белок-адаптер клатрин (Ogimoto et al., 2000) и кавеолин (Wang et al., 2004). Кроме центральная петля α-субъединицы Na,K-АТФазы взаимодействует с того. фосфолипазой С-у (PLCу), а N-конец - с рецепторами инозитол-3-фосфата (IP3) (Yuan et al., 2005). В эту сигналосому вовлечены некоторые другие заякоривающие белки, а также Src-киназа, важный модулятор внутриклеточного сигналинга, опосредованного ионами кальция (Haas et al., 2000; Liu et al., 2000). Воздействие ингибитора Na,K-АТФазы кардиотонического стероида уабаина приводит к высвобождению Src-киназы и к активации дальнейших сигнальных путей, опосредованных ионами кальция (Xie, Cai, 2003). Применение уабаина в субмикромолярных концентрациях приводит к активации Src-киназы путем фосфорилирования, что подтверждается многими авторами (Tian et al., 2006; Li et al., 2009; Lai et al., 2013; Ye et al., 2013; Banerjee et al., 2015; Venugopal, Blanco, 2017; Rajamanickam et al., 2017b). Тем не менее, существует ряд работ, в которых

фосфорилирование и последующая активация Src-киназы после введения уабаина объясняется высвобождением пула АТФ за счет прекращения потребления со стороны ингибированной Na,K-ATФазы (Weigand et al., 2012; Gable et al., 2014). Однако некоторые исследования на скелетных мышцах демонстрируют, что субмикромолярные и микромолярные концентрации уабаина значительно повышают уровень внутриклеточной фосфорилированой Src-киназы и при этом не влияют на глобальное соотношение АТФ/АДФ (Kotova et al., 2006a,b).

Для модуляции активности Na,K-ATФазы в фундаментальных исследованиях применяют уабаин, который относится к группе сердечных гликозидов, способных связываться с α-субъединицей Na,K-АТФазы. Уабаин широко известен как ингибитор Na,K-ATФазы, однако в ряде работ установлено, что наномолярные концентрации уабаина путем модификации активности Na, K-ATФазы могут усиливать барьерные свойства эпителия и снижать проницаемость плотных контактов (Larre et al., 2010, 2014; Markov et al., 2020). Способность уабаина влиять на экспрессию клаудинов в барьерных тканях опосредована модуляцией сигнального каскада cSrc/Erk1/2, что было неоднократно продемонстрировано в исследованиях клеточных линий (Larre et al., 2010; Dietze et al., 2015; Venugopal, Blanco, 2017). В клетках Сасо-2 дезорганизация плотных контактов, вызванная свободнорадикальными формами кислорода, также была опосредована активацией c-Src (Basuroy et al., 2003). На клеточной линии почки собаки MDCK было показано, что наномолярные концентрации уабаина (10-50 нМ) значительно увеличивают трансэпителиальное сопротивление, что сопровождается изменением в составе белков плотных контактов (Larre et al., 2010). В других исследованиях на клетках Сертоли были продемонстрированы аналогичные эффекты уабаина в наномолярной концентрации, связанные с усилением барьерных свойств и изменением молекулярного состава плотных контактов (Dietze et al., 2015; Rajamanickam et al., 2017а). В недавнем исследовании на клетках линии IPEC-J2 инкубация с уабаином в дозе 10 нМ в течение 19 дней стимулировала формирование эпителиального барьера, повышала трансэпителиальное сопротивление и уровень фосфорилированной cSrcкиназы, а также увеличивала экспрессию клаудина-1, -5 и снижала уровень клаудина-12 (Markov et al., 2020). В тощей кишке крыс хроническое введение уабаина приводило к повышению экспрессии клаудина-1, -3 и -5 без воздействия на

клаудин-2 и -4. В этом же исследовании в толстой кишке крыс хроническое введение уабаина вызывало снижение уровня клаудина-3 (Markov et al., 2020).

В последние годы появляются данные о протекторном эффекте уабаина в отношении различных патологических воздействий, опосредованном широкой сетью функциональных взаимодействий уабаина и Na,K-АТФазы, в том числе и с белками плотных контактов. Так, протекторное действие уабаина показано в отношении липополисахарид-индуцированного воспаления в легких мышей: уабаин облегчал клиническую картину острого легочного поражения, вызывал снижение продукции TNF-α, IL-1β и IL-6, ингибировал инфильтрацию нейтрофилов и макрофагов, а также уменьшал отек легких и повышал проницаемость легочного эпителия (Wang et al., 2018). Было показано, что уабаин регулировал процесс воспаления путем ингибирования сигнального пути TNF-α/NF-кВ в клетках HeLa и клетках 293Т (Yang et al., 2005). Протекторный эффект уабаина в тонкой кишке крыс в условиях введения ЛПС был опосредован модуляцией уровня клаудинов плотных контактов (Markov et al., 2020). Небольшое количество данных указывают на перспективу использования уабаина в диапазоне наномолярных концентраций для модуляции радиочувствительности клеток. Так, уабаин в дозе 0.01 нМ повышал экспрессию Bcl-2, но не NF-кВ в нейронах в течение 6 ч после инъекций, в результате чего снижался уровень апоптоза, спровоцированного внешним цитотоксическим воздействием (Golden et al., 2006). Известно, что уабаин повышает радиочувствительность злокачественных раковых клеток, но не клеток нормальной ткани (Lawrence et al., 1988; Verheye-Dua et al., 1998, 2000). Эта находка делает уабаин перспективным претендентом на роль протектора нормальных тканей в условиях лучевой терапии.

Таким образом, на данный момент имеются сведения о регуляции низкими концентрациями уабаина проницаемости эпителиев, как на клеточных культурах, как и в in vivo моделях. Известно, что уабаин способен оказывать протекторный эффект на проницаемость барьерных тканей в условиях патогенного воздействия, например, подавлять воспалительную реакцию, которая была вызвана ЛПС. В условиях лучевого поражения уабаин оказывает влияние на уровень апоптоза, однако данные о его способности регулировать уровень белков плотных контактов при воздействии ионизирующего излучения, отсутствуют.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Дизайн экспериментов, использованные животные

Во всех сериях экспериментов использовали самцов крыс Вистар (*Rattus norvegicus*) (250-280 г, получены из Института Физиологии им. И.П.Павлова РАН). Животных содержали в условиях вивария при естественном освещении со свободным доступом к пище и воде. Протокол эксперимента одобрен Этическим комитетом в области исследований на животных СПбГУ (заявка № 131-03-5 от 13 декабря 2017 года) и соответствовал требованиям Европейского Союза, изложенным в директиве 2010/63/EU по экспериментам на животных.

В рамках первой серии экспериментов по выявлению дозо- и сегментзависимости воздействия ионизирующего излучения крысы (n=20) были разделены на 4 группы: а) интактные животные, не подвергавшиеся никакому внешнему воздействию, б) ложно-облученные животные, подвергшиеся процедуре ложного облучения, в) животные, облученные в дозе 2 Гр, г) животные, облученные в дозе 10 Гр. Контроль веса животных проводился после процедуры облучения, а также ежедневно в одно и то же время в течение 72 ч после облучения. Через 72 ч после облучения проводилось умерщвление животных с последующим извлечением фрагментов тощей и толстой кишки для регистрации трансэпителиальной разности потенциалов, трансэпителиального сопротивления, тока «короткого замыкания» и измерения проницаемости для флуоресцеина натрия в камере Уссинга. Фрагменты тощей и толстой кишки были заморожены на -80°С для дальнейшего анализа методом Вестерн-блот уровня белков плотных контактов. Кроме того, некоторые фрагменты тощей и толстой кишки были помещены в 10% формалин для дальнейшего проведения иммунофлуоресцентного анализа локализации белков плотных контактов, а также световой микроскопии ткани с оценкой морфометрических показателей. Кровь из сердца отбирали в момент вскрытия животных для оценки уровня лейкоцитов.

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 инъекциям физиологического раствора в течение 6 сут, на 4-е сут подвергнуты процедуре ложного облучения, б) «Уабаин» – подвергались 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. Контроль веса животных проводился ежедневно в одно и то же время в течение всего эксперимента. Через 72 ч после облучения (на 7-е сутки эксперимента) проводилось умерщвление животных с последующим извлечением фрагментов тощей и толстой кишки для регистрации измерения разности потенциалов, ТЭС, тока «короткого замыкания» И проницаемости для флуоресцеина натрия в камере Уссинга. Фрагменты тощей и толстой кишки были заморожены на -80°С для дальнейшего проведения анализа уровня белков плотных контактов методом Вестерн-блот. Кроме того, некоторые фрагменты тощей и толстой кишки были помещены в 10% формалин для дальнейшего проведения иммунофлуоресцентного анализа локализации белков плотных контактов, а также световой микроскопии ткани оценкой с морфометрических показателей.

2.2. Процедура облучения животных

Во всех сериях экспериментов проводилось однократное острое внешнее облучение всего тела крыс с использованием аппарата РУМ-17 (МосРентген, Россия). В течение процедуры облучения животные были помещены в закрытый бокс из оргстекла, полностью ограничивающий их движение (крышка была снабжена отверстиями для проникновения воздуха). Фокусное расстояние от бокса с животным до рентгеновской трубки составляло 50 см; мощность дозы – 0.31 Гр/мин. Для проверки поглощенной дозы использовался индивидуальный дозиметр с последующим снятием показаний с помощью измерительного устройства ГО-32 (Спецоборона, Россия). Для процедуры ложного облучения животных помещали в бокс под выключенную рентгеновскую трубку.

Умерщвление животных проводили, осуществляя предварительную анестезию путем однократного внутримышечного введения золетила 100 (Virbac, Франция) в дозе 10 мг/кг с последующей декапитацией.

Процедура облучения проводилась совместно с к.м.н. А.В.Завирским на базе кафедры военной токсикологии и медицинской защиты Военно-медицинской академии им. Кирова.

2.3. Регистрация электрофизиологических параметров в камере Уссинга Для регистрации электрофизиологических параметров и определения межклеточной проницаемости фрагменты тканей тощей и толстой кишки помещали в камеры Уссинга (Thomson et al., 2019), представляющие собой полые цилиндры из двух половин, между которыми вертикально монтируется фрагмент ткани для исследования. Каждая установка снабжена двумя резервуарами из оргстекла, сообщающимися с серозным и мукозным компартментом камеры и заполненными раствором Кребса-Рингера. Раствор, использовавшийся в экспериментах, содержал (в мМ): NaCl, 119; KCl, 5; CaCl₂, 1,2; MgCl₂, 1,2; NaHCO₃, 25; Na₂HPO₄, 1,6; NaH₂PO₄, 0,4; d-глюкоза, 10 (pH 7,4). Для регистрации тока и напряжения в каждом компартменте камеры имелись порты для одного токового электрода и одного электрода напряжения, подключенных к предусилителю EVC3 и многоканальному автоматическому фиксатору EVC-4000 (Worls Precision Instruments, США). В течение регистрации (60 мин) в камерах поддерживалась температура 37 °С при помощи термостата и рубашки с омывающим раствором, подведенной к каждой камере. Раствор, заполняющий стеклянные резервуары каждой камеры, в течение регистрации непрерывно насыщался карбогеном (95% О2 и 5% СО2).

Перед началом каждой регистрации экспериментальную установку собирали без фрагмента ткани, резервуары заполняли раствором Кребса-Рингера с целью компенсации сопротивления раствора и разности потенциалов на электродах напряжения. После этого установку повторно собирали, помещая в камеры фрагменты тканей. В течение первых 5 мин после установки ткани регистрация электрофизиологических параметров не проводилась с целью стабилизации ткани и адаптации к условиям эксперимента. Площадь изучаемого участка ткани определялась диаметром апертуры между серозной и мукозной половинами камеры Уссинга и равнялась 0.126 см².

Регистрация разности потенциалов (мВ) осуществлялась в каждой камере с помощью электродов напряжения, расположенных с мукозной и серозной стороны

ткани, соответственно. Регистрация значения тока «короткого замыкания» (мкА) осуществлялась при краткосрочной фиксации напряжения на нулевом уровне (0 мВ) с помощью токовых электродов. Для определения трансэпителиального сопротивления ткани регистрировали величину напряжения при фиксации тока на величине 10 мкА. Трансэпителиальное сопротивление рассчитывали по закону Ома, учитывая площадь апертуры камеры (0.126 см²), и выражали в Ом см². В работе приведены значения разности потенциалов, трансэпителиального сопротивления, и тока «короткого замыкания» в динамике в течение 60 мин регистрации в камере Уссинга, а также на 5-й минуте регистрации.

2.4. Изучение межклеточной проницаемости различных участков кишки с помощью флуоресцеина натрия

Фрагменты толстой и тощей кишки устанавливали в камеры Уссинга по методике, описанной ранее. Для измерения межклеточной проницаемости фрагментов кишки 50 мкл флуоресцеина натрия (Sigma Aldrich, США) помещали в камеру Уссинга с апикальной стороны для получения финальной концентрации 0.1 мМ. Раствор с базолатеральной стороны собирали через 60 мин инкубации для определения концентрации диффундировавшего через ткань флуоресцеина натрия. Для построения калибровочной кривой использовали разведения флуоресцеина натрия в известных концентрациях в растворе Кребса-Рингера (1, 2.5, 5, 10, 20, 25, 30, 40, 50, 100, 1000 нМ). Измерение интенсивности сигнала флуоресцеина натрия проводили в 96-луночных планшетах с помощью лазерного сканера Typhoon FLA 9500 (GE, США) при использовании волны возбуждения с длиной 473 нм и напряжении 430 В. Полученное изображение планшета (размер пикселя 100 мкм) анализировали с помощью программного обеспечения ImageG (National Institutes of Health, USA). Значение проницаемости (Papp) рассчитывали по формуле Papp = (dQ)/qt) / (A*C0), где (dQ / qt) – концентрация флуоресцеина натрия с серозной стороны камеры Уссинга через 60 мин инкубации (М); А – площадь исследуемого участка ткани (см²); C0 – концентрация флуоресцеина натрия в растворе с мукозной стороны в начальный момент времени (M). Учитывая соотношение 1л = 1000см³, размерность проницаемости представлена в см/с.

2.5. Оценка уровня лейкоцитов в крови крыс после воздействия ионизирующего излучения

С целью оценки общего состояния животного и контроля процедуры облучения свежую цельную кровь для гематологической оценки уровня лейкоцитов отбирали из сердца. Для забора крови после анестезии и последующего умерщвления осуществляли стандартное вскрытие грудной клетки. С помощью инсулинового шприца, спрыснутого гепарином, 1.5 – 2 мл крови отбирали в стерильные вакуумные пробирки, содержащие ЭДТА-К2. После взятия крови пробирку немедленно осторожно переворачивали 5-7 раз для наилучшего перемешивания крови и антикоагулянта. Свежую отобранную цельную кровь инкубировали не более чем на 2-3 ч в холодильнике при 4°C. Содержание лейкоцитов в крови измеряли с помощью автоматического гематологического анализатора XN-1000 (Sysmex Corporation, Япония). Для подсчета отдельных лейкоцитарных фракций (сегментоядерных нейтрофилов И лимфоцитов) изготавливали тонкие мазки крови, окрашенные азур II-эозином по Романовскому-Гимза по рутинной методике. Полученные мазки анализировали с помощью светового микроскопа Leica DMI6000 (Leica Microsystems, Германия), выполняя подсчет относительного содержания нейтрофилов и лимфоцитов на 100 обнаруженных лейкоцитов.

2.6. Измерение концентрации уабаина в сыворотке крови крыс методом иммуноферментного анализа

Свежую цельную кровь отбирали у крыс в экспериментах по воздействию ионизирующего излучения в условиях введения уабаина, и отстаивали в течение 2 ч. Сыворотку отделяли путем центрифугирования на 4000 об/мин в течение 20 мин при комнатной температуре. Концентрация уабаина в сыворотке крови крыс была измерена с помощью набора для иммуноферментного анализа CEV857Ge (Cloud Clone Corp., Wuhan, China). 50 мкл сыворотки от каждого животного и прилагающихся к набору стандартов с известной концентрацией уабаина помещали внутрь лунок 96-лучночного планшета, содержащих антитела к уабаину. Затем в лунки вносили по 50 мкл реагента для детекции А, планшет помещали на шейкер и инкубировали в течение 1 ч при 37°С. Затем жидкость из каждой лунки собирали и

трижды промывали буфером для отмывок. 100 мкл раствора для детекции В вносили в лунки и инкубировали 30 мин при 37°С. Жидкость вновь собирали, после чего лунки промывали 5 раз. Затем вносили 90 мкл субстратного раствора из набора для анализа и инкубировали 15 мин при 37°С. После этого в лунки помещали по 50 мкл останавливающего реакцию буфера и немедленно оценивали концентрацию уабаина. Определение концентрации выполняли спектрофотометрически с применением мультимодального ридера SPECTROstar при длине волны 450 нм.

Эксперименты выполнены совместно с д.б.н. В.В. Кравцовой

2.7. Изучение гистологической структуры кишки методом световой микроскопии с количественной морфометрией

Фрагменты тощей и толстой кишки получали от всех групп исследованных животных и помещали в раствор 10% формалина (БиоВитрум, Санкт-Петербург) сразу после иссечения на 48 ч. Процедура заливки тканей в парафиновые блоки проводилась по рутинной методике. С помощью ротационного микротома Leica RM2265 (Leica Microsystems, Ветцлар, Германия) изготавливали срезы тканей толщиной 5 мкм, которые монтировались на предметные стекла и использовались для дальнейшего проведения морфологического исследования методом световой микроскопии или иммунофлуоресцентного анализа. Для изучения гистологической структуры тканей методом световой микроскопии после процесса депарафинизации в ксилоле и дегидратации в батарее спиртов с нисходящей концентрацией срезы окрашивались гематоксилином (1 мин, 23°) и эозином (30 сек, 23°). После окрашивания срезы вновь подвергались обводнению в спиртах с восходящей концентрацией. Полученные гистологические срезы изучали с помощью светового микроскопа Leica DMI6000 (Leica Microsystems, Германия). Фотографии получены с помощью цветной цифровой камеры с разрешением 8 Мп (Leica, Германия) при увеличении ×100 и ×200 с использованием программного обеспечения Leica Application Suite (Leica Microsystems, Германия).

Для оценки изменения гистологической структуры тканей тощей и толстой кишки после облучения проводили количественную морфометрию полученных изображений с помощью программного обеспечения ImageJ (National Institutes of Health, USA). У каждого животного исследовали два фрагмента ткани, для каждого



Рисунок 2. Схема, отображающая морфометрические показатели, оцененные в тощей (А) и толстой кишке (Б) крыс после воздействия ионизирующего излучения.

ВВ-высота ворсинки, ДВ – диаметр ворсинки, ГК – глубина крипты, ДК – диаметр крипты, ПО – толщина подслизистой основы, МС – толщина мышечных слоев вместе с соединительнотканной оболочкой.

из которых не менее двух срезов, в срезе исследовали не менее пяти полей зрения. Количественный анализ проводился вслепую. В толстой кишке оценивали следующие морфометрические параметры (рис. 2): глубина крипт (ГК) и диаметр крипт (ДК), толщина подслизистой основы (ПС), толщину мышечных слоев и соединительнотканной оболочки (МС). В тощей кишке, помимо указанных параметров, измеряли также высоту ворсинки (ВВ) и диаметр ворсинки (ДВ).

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

2.8. Изучение комплекса белков плотных контактов методом Вестернблот

Для определения уровня белков семейства клаудина, а также окклюдина, трицеллюлина и активированной каспазы-3, и сравнения их содержания в облученных группах с контрольными, использовался метод Вестерн-блот анализа (Hnasko, Hnasko, 2015).

Гомогенизация фрагментов ткани тощей и толстой кишки. Замороженные на -80°С фрагменты тканей помещали в эппендорфы и добавляли 1 мл лизирующего RIPA буфера (табл.2), содержащего детергенты для разрушения структур клеток и тканей. В лизирующий RIPA буфер предварительно добавляли ингибиторы протеаз Complete mini-EDTA-free tablets (Roche, Германия) из расчета 1 таблетка на 10 мл буфера, для предотвращения протеолиза белков в образцах тканей. В эппендорф, содержащий лизирующий буфер и образцы тканей, добавляли 2 стеклянных или металлических шарика для проведения последующей гомогенизации. Эппендорфы центрифугировали при температуре 4°, 15000 об/мин в течение 15 мин. Образец ткани аккуратно доставали пинцетом, измельчали и вновь помещали внутрь эппендорфа. Ткань гомогенизировали при помощи гомогенизатора в течение 4 подходов по 1 мин на частоте 25 об/сек. Между периодами встряхивания эппендорфы постоянно помещались на лед. После механической гомогенизации образцы центрифугировали в течение 1 мин при комнатной температуре. 900 мкл полученной суспензии перемещали в пробирки 1.5 мл и инкубировали в течение 15 мин на льду при постоянном помешивании для дальнейшего лизиса. После окончания инкубации суспензию центрифугировали в течение 15 мин при 15000g и

4°С. Полученный супернатант собирали в пробирки 2.0 мл для дальнейшего количественного определения содержащегося в пробах белка.

Определение концентрации белка. Для определения концентрации белка полученные в результате гомогенизации тканей пробы предварительно разводили в 5 раз. После этого в отдельные ячейки в 96-луночный планшет вносили по 25 мкл каждой пробы и добавляли 200 мкл реагентов BSA Pierce Protein Assay (Thermo Scientific, США). Для построения калибровочной кривой в отдельные лунки планшета вносили 25 мкл лизирующего буфера 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 200 мкл реагентов BSA Pierce Protein Assay. После внесения белковых проб планшет инкубировали в термостате в течение 30 мин при 37°С. После инкубации планшет помещали в мультимодальный ридер SPECTROstar® Nano (BMG LABTECH, Германия) для определения концентрации белка в пробах (длина волны 562 нм). На основе полученных данных с учетом первоначального разведения рассчитывали объем кажлой пробы лля дальнейшего проведения электрофореза В полиакриламидном Stain-Free геле (из расчета 40 мкг тотального белка на лунку).

Электрофорез в Stain-Free геле. Для разделения белков в составе выделенной фракции по молекулярной массе использовался вертикальный электрофорез в Stain Free геле (Bio Rad Laboratories, США). Перед проведением электрофореза к белковым пробам добавляли раствор Laemmli (Bio Rad Laboratories, США) и нагревали с помощью термошейкера (5 мин; 95°С). 40 мкл полученной пробы помещали в кармашки геля. В отдельный кармашек геля вносили 5 мкл маркера Precision Plus Protein Dual Color Standards (Bio Rad Laboratories, США). Электрофорез проводился в буфере для электрофореза (табл.2) при постоянном напряжении 150 В (60 мин; 24°С). После проведения электрофорезa Stain-Free гели были активированы в ультрафиолете в течение 1 мин с помощью ChemiDoc XRS+ Imaging System (Bio Rad Laboratories, США). После активации получали изображение гелей с целью проверки разделения белков в ходе электрофореза.

Turbo-blot трансфер белков с геля на мембрану. На следующем этапе белки под действием электрического тока переносились с Stain-Free геля на поливинилденфторидные (PVDF) мембраны (GE Healthcare, Германия). PVDF

предварительно активировались в метаноле (30 с; 24 °C) и инкубировались в буфере для трансфера (табл.2). Электроперенос осуществлялся с помощью системы Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio Rad Laboratories, CША) при постоянном напряжении 25 В в течение 7 мин в буфере для трансфера (табл.2). Качество переноса белков с геля на мембрану подтверждалось путем получения изображения геля и мембраны с помощью ChemiDoc XRS+ Imaging System (Bio Rad Laboratories, CША).

Иммуноокрашивание белков на PVDF мембране. После процедуры трансфера PVDF мембраны инкубировали в блокирующем буфере (табл.2) (120 мин при комнатной температуре) для предотвращения неспецифического связывания антител. После этого PVDF мембраны инкубировали в течение ночи в растворе либо первичных мышиных антител к клаудину-2 и окклюдину (табл.3, 1:1000, 4°C), либо в растворе первичных кроличьих антител к клаудину-1, -3, -4, -8 и трицеллюлину (табл.3, 1:1000, 4°C). После инкубации PVDF мембраны отмывали в PBST буфере (табл.2) (3 х 5 мин при комнатной температуре) и инкубировали в растворе вторичных козьих антимышиных или козьих антикроличьих антител (табл. 3) (1:1000, 45 мин при комнатной температуре). После инкубации со вторичными антителами мембраны промывали в PBST буфере (табл.2) (3 х 5 мин при комнатной температуре). После инкубации со вторичными антителами мембраны промывали в PBST буфере (табл.2) (3 х 5 мин при комнатной температуре).

Денситометрия. Мембраны инкубировали в растворе Clarity [™] Western ECL (Bio Rad Laboratories, CША) для дальнейшей хемилюминесцентной детекции белков интереса (5 мин при комнатной температуре). Детекция сигнала осуществлялась на ChemiDoc XRS+ Imaging System (Bio Rad Laboratories, CША). Обработка изображения проводилась с помощью программного обеспечения ImageLab SoftWare (Bio Rad Laboratories, CША). Полученные в результате денситометрии значения были выражены в оптических единицах. Для последующей статистической обработки данные были переведены в условные единицы, где плотность сигнала в контрольной группе принималась за 100%, и относительно этой величины высчитывалось значение в экспериментальных группах. В связи с отсутствием сигнала для клаудина-3 и -4 в тонкой кишке, в первой серии экспериментов за 100% принималась плотность сигнала в группе «2 Гр», во второй серии - в группе «Радиация 10 Гр». При отсутствии сигнала от соответствующих белков значение денситометрии принималось за ноль.

Таблица 2. Состав растворов, использованных для проведения Вестерн-блот анализа

Название	Состав
Tris- HCl буфер	1,0 M Tris; HCl до pH 7,4
Лизирующий RIPA буфер	10mM Tris- HCl буфера (рН 7,4), 150 мМ
	NaCl, 0,5% Тритон Х-100, 0,1 % SDS
Буфер для электрофореза	25 мМ Tris; 190 мМ глицин; 0,1% SDS;
	рН 8,3
Буфер для переноса	25 мМ Tris; 190 мМ глицин; 0.01% SDS;
	рН 8,3
PBS	1.47 мМ КН2РО4; 4.29 мМ
	Na2HPO4*7H2O; 137 MM NaCl; 2.68 MM
	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 буфер	1.47 мМ КН2РО4; 4.29 мМ
	Na2HPO4*7H2O; 137 мМ NaCl; 2.68 мМ
	KCl; 5% сухое обезжиренное молоко
Буфер для разведения первичных	1.47 мМ КН2РО4; 4.29 мМ
антител	Na2HPO4*7H2O; 137 мМ NaCl; 2.68 мМ
	KCl; 5% сухое обезжиренное молоко
Буфер для разведения вторичных	1.47 мМ КН2РО4; 4.29 мМ
антител	Na2HPO4*7H2O; 137 мМ NaCl; 2.68 мМ
	KCl; 2,5% сухое обезжиренное молоко

Таблица 3. Первичные и вторичные антитела, использованные для

проведения Вестерн-блота и иммунофлуоресцентного анализа

Антитела	№, производитель
Антитела против клаудина-1, кроличьи,	№71-7800, Invitrogen, CШA
поликлональные	
Антитела против клаудина-2,	№32-5600, Invitrogen, CША
мышиные, моноклональные	
Антитела против клаудина-3, кроличьи,	№34-1700, Invitrogen, CША
поликлональные	
Антитела против клаудина-4, кроличьи,	№36-45800, Invitrogen, CIIIA
поликлональные	
Антитела против клаудина-8, кроличьи,	№40-0700Z, Invitrogen, CIIIA
поликлональные	
Антитела против окклюдина, мышиные,	№33-1500, Invitrogen, CША
моноклональные	
Антитела против трицеллюлина,	№48-8400, Invitrogen, CША
кроличьи, поликлональные	
Антитела против активированной	№ 9661s, CellSignaling, CША
каспазы-3, кроличьи, поликлональные	
Вторичные антикроличьи антитела,	№ AB205718, Abcam, UK
HRP	
Вторичные антимышиные антитела,	№ AB205719, Abcam, UK
HRP	
Вторичные антикроличьи антитела	№ a32736 Invitrogen, CШA
Alexa Fluor Plus 555, H&L	
Вторичные антимышиные антитела	№ a32727, Invitrogen, CШA
Alexa Fluor Plus 555, H&L	

2.9. Иммунофлуоресцентное исследование локализации белков плотных контактов в срезах тканей тонкой и толстой кишки

Для оценки локализации белков методом непрямой флуоресценции изготавливались срезы тканей тонкой и толстой кишки на предметных стеклах SuperFrostPlus (Thermo Scientific, США). Перед нанесением антител срезы подвергались депарафинизации в ксилоле и дегидратации в батарее спиртов с нисходящими концентрациями. После промывки в растворе PBS (3 раза по 15 мин, 22°) стекла кипятили в цитратном буфере (Биовитрум, Россия) в течение 20 мин на водяной бане. После отмывки в PBS (3 раза по 15 мин, 22°) стекла инкубировали в блокировочном растворе (10% BSA, 0.2% Triton-100) в течение 2 ч при температуре 37.5° на водяной бане. Разведение первичных и вторичных антител проводили в растворе PBS, содержащем 3% BSA и 0.2% Triton X-100. Для определения локализации белков плотных контактов стекла инкубировали с первичными кроличьими антителами к клаудинам-1, -3, -4 (табл. 3) (1:100, 4°, 1 сутки) либо с первичными мышиными антителами к клаудину- 2 (табл. 3) (1:100, 4°, 1 сутки). После промывки стекол в PBS (3 раза по 15 мин, 22°) на срезы наносили вторичные козьи антикроличьи либо антимышиные антитела, конъюгированные флуоресцентной меткой (табл. 3) (1:1000, 120 мин, 37°). Для проведения негативного контроля на стекла со срезами тонкой и толстой кишки после инкубации в блокирующем буфере наносили раствор PBS с 3% БСА и 0.2% Triton Х-100, не содержащий первичных антител, с последующей инкубацией со вторичными антителами. Перед нанесением покровных стекол срезы инкубировали с красителем DAPI (Sigma-Aldrich, США) (1:5000, 5 мин, 22°) для визуализации клеточных ядер. Анализ полученных изображений проводился с помощью лазерного конфокального сканирующего микроскопа Leica TCS SP5 (Leica Microsystems, Ветцлар, Германия). Иммунофлуоресценцию для клаудинов-1, -2, -3, -4 регистрировали в зеленой области спектра.

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

2.10. Статистическая обработка полученных данных. Статистический анализ выполняли с помощью программного обеспечения GraphPad Prism v.8

(GraphPad, США). При обработке результатов измерения электрофизиологических параметров и проницаемости в зависимости от дозы и периода после облучения, динамики массы тела животных в течение 72 ч после облучения, а также электрофизиологических параметров в динамике в течение 60 минут регистрации в камере Уссинга, статистическую значимость разницы средних значений в группах оценивали с помощью двухфакторного дисперсионного анализа с корректировкой Тьюки. При обработке результатов измерения электрофизиологических параметров на 5-й минуте регистрации в камере Уссинга, уровня содержания белков по результатам Вестерн-блот анализа, концентрации уабаина, а также межклеточной проницаемости ткани для флуоресцеина натрия, статистическую значимость разницы средних значений в группах оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа с корректировкой Тьюки. При сравнении результатов измерения уровня лейкоцитов и лейкоцитарных фракций в группе крыс, облученных в дозе 10 Гр, с контрольной группой, использовали непараметрический критерий Манна-Уитни. Все данные представлены как среднее значение ± стандартная ошибка средней. Значение вероятности р<0.05 рассматривали как статистически достоверное.

ГЛАВА З. ИЗУЧЕНИЕ ДОЗО- И СЕГМЕНТ-СПЕЦИФИЧНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА БАРЬЕРНЫЕ ФУНКЦИИ ТОЩЕЙ И ТОЛСТОЙ КИШКИ КРЫС

3.1. Динамика массы тела и общее состояние животных после облучения

Группа интактных животных (n=6) непрерывно набирала вес в течение периода измерений, прибавив 10% массы к третьим суткам по сравнению с первым днем исследования (рис. 3). Динамика изменения веса в ложно-облученной группе (n=4) крыс достоверно отличалась от наблюдаемой у интакных животных в течение всего периода измерений (p<0.05, двухфакторный дисперсионный анализ). Динамика изменения веса в группе «2 Гр» также достоверно отличалась от интактных животных (n=4, p<0.05, двухфакторный дисперсионный анализ), но не отличалось от ложно-облученных (рис. 3). Облучение в дозе 10 Гр приводило к значительной потере массы тела по сравнению с интактными и ложно-облученными животными (p<0.001, двухфакторный дисперсионный анализ). В этой группе к третьим суткам потеря массы тела составляла 16%, и при визуальном осмотре животных обнаруживали признаки лучевого поражения: профузную диарею, прорежение шерстного покрова, носовую геморрагию, описанные ранее (Huang et al., 2019; Horwath et al., 1997; Gu et al., 2020). 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.

3.2. Оценка уровня лейкоцитов в крови крыс после воздействия ионизирующего излучения

Для биоиндикационного подтверждения процедуры облучения проводили анализ количества лейкоцитов в крови, отобранной из сердца при вскрытии ложнооблученных животных и крыс, облученных в дозе 10 Гр (рис. 4). В группе ложно-



Рисунок 3. Динамика веса крыс в течение трех дней после облучения # p<0.05 - группа интактных животных по сравнению с ложно-облученными ** p<0.01, ***p<0.001 - группа животных, облучённых в дозе 10 Гр, по сравнению с ложно-облученными

Двухфакторный дисперсионный анализ с коррекцией Тьюки, n=4-6. Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка средней. облученных животных (n=4) было выявлено $8.3 \pm 1.1 \cdot 10^{3}$ /мкл лейкоцитов, что соответствует нормальным гематологическим показателям для крыс породы Вистар (World Health Organization, 1971). Воздействие ионизирующего излучения в дозе 10 Гр вызвало достоверное снижение уровня лейкоцитов в 13 раз по сравнению с ложно-облученными крысами (n=6, $0.6 \pm 0.1 \cdot 10^{3}$ /мкл, p<0.01, однофакторный дисперсионный анализ).

В мазках периферической крови крыс, окрашенных азур II-эозином по Романовскому, было подсчитано количество лимфоцитов и сегментоядерных нейтрофилов. В ложно-облученной группе было выявлено $5.7 \pm 0.9 \cdot 10^3$ /мкл лимфоцитов и $2.1 \pm 0.3 \cdot 10^3$ / мкл сегментоядерных нейтрофилов. В группе животных, облученных в дозе 10 Гр, было подсчитано $0.3 \pm 0.1 \cdot 10^3$ /мкл лимфоцитов и $0.3 \pm 0.1 \cdot 10^3$ /мкл сегментоядерных нейтрофилов. Таким образом, облучение сопровождалось значительной лучевой лейкопенией, которая в основном выражалась в снижении лимфоцитов и сегментоядерных нейтрофилов, что соответствует ожидаемой гематологической картине, наблюдаемой при облучении крыс в дозе 10 Гр (World Health Organization, 1971; Mihandoost et al., 2014).

3.3. Электрофизиологические характеристики разных участков кишки после воздействия ионизирующего излучения

Трансэпителиальная разность потенциалов. В группе интактных (п(число фрагментов ткани в камере Уссинга)=24), ложно-облученных (n=16) и облученных в дозе 2 Гр (n=16) животных трансэпителиальная разность потенциалов постепенно возрастала в течение 60 мин регистрации в камере Уссинга. В этих группах мукозная поверхность стенки тощей кишки была заряжена отрицательно по отношению к серозной стороне в течение всей регистрации (рис. 5). В группе интактных животных к 5-й минуте регистрировали значение разности потенциалов -1.0 \pm 0.1 мВ; к 60-й минуте – 0.3 \pm 0.1мВ. В группе ложно-облученных животных к 5-й минуте регистрировали значение всей регистрировали значение облученных животных к 5-й минуте ложно-облученных и потенциалов -1.0 \pm 0.1 мВ; к 60-й минуте регистрировали разность потенциалов -1.1 \pm 0.2 мВ, к 60-й минуте -0.4 \pm 0.2 мВ. Разность потенциалов в тощей кишке не отличалась у ложно-облученных и интактных животных ни на одном из исследованных промежутков времени. Облучение в дозе 2 Гр также не приводило к изменению трансэпителиальной



Рисунок 4. Общее количество лейкоцитов, лимфоцитов и нейтрофилов в крови крыс через 72 ч после облучения в дозе 10 Гр

** p<0.01 группа животных, облученных в дозе 10 Гр, по сравнению с ложнооблученными животными

Критерий Манна-Уитни; n = 4-6.



Рисунок 5. Трансэпителиальная разность потенциалов в тощей (а, в) и толстой (б, г) кишке крыс после облучения

(а,б) Динамика разницы потенциалов в течение регистрации в камере Уссинга

* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 - группа, облученная в дозе 10 Гр, по сравнению с ложно-облученными животными. ## p<0.01 - группа, облученная в дозе 2 Гр, по сравнению с ложно-облученными животными

Двухфакторный дисперсионный анализ с коррекцией Тьюки; n = 16-24

(в,г) Трансэпителиальная разность потенциалов к 5-й мин регистрации в камере Уссинга

* p<0.05, *** p<0.001 - группа, облученная в дозе 10 Гр, по сравнению с ложно-облученными животными

Однофакторный дисперсионный анализ с коррекцией Тьюки; n = 16-24 Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка средней. разности потенциалов в тощей кишке; к 5-й минуте значение было -1.6 \pm 0.2 мВ, к 60-й -0.9 \pm 0.1 мВ. Облучение в дозе 10 Гр приводило к существенному снижению поляризации по сравнению с ложно-облученными животными (p<0.001, двухфакторный дисперсионный анализ) (рис. 5). В группе «10 Гр» к 5-й минуте регистрации регистрировали значение разности потенциалов 0.0 \pm 0.1 мВ; к 60-й минуте - 0.1 \pm 0.1 мВ. Таким образом, ионизирующее излучение дозо-специфично воздействовало на разность потенциалов в тощей кишке, при этом доза 10 Гр вызывала существенную деполяризацию.

толстой В кишке трансэпителиальная разница потенциалов была отрицательной во всех группах животных в течение регистрации в камере Уссинга (рис. 5). У интактных животных (n=24) разность потенциалов составляла к 5-й минуте -0.7 ± 0.1 мB, к 60-й минуте -0.3 ± 0.1 мB. У ложно-облученных животных (n=16) не выявлено отличий от интактных животных по разнице потенциалов в толстой кишке; к 5-й минуте зафиксировали значение -0.7 ± 0.2 мB, к 60-й минуте - 0.2 ± 0.1 мВ. Облучение в дозе 2 Гр также не вызвало изменения поляризации; к 5-й минуте в группе «2 Гр» (n=16) зарегистрировали величину -0.9 ± 0.2 мВ, к 60-й минуте -0.3 ± 0.2 мВ. Облучение в дозе 10 Гр (n=24) привело к увеличению поляризации в толстой кишке по сравнению с ложно-облученными особями (p<0.05, двухфакторный дисперсионный анализ). К 5-й минуте в группе «10 Гр» зафиксировали значение разности потенциалов -1.5 \pm 0.3 мB, к 60-й минуте -1.2 \pm 0.4 мВ. Таким образом, в толстой кишке ионизирующее излучение имело дозозависимый эффект на разность потенциалов: облучение в дозе 10 Гр приводило к существенной поляризации, в то время как воздействие в дозе 2 Гр не влияло не разность потенциалов.

Стоит отметить, что в тощей кишке доза 10 Гр приводила к снижению поляризации, а в толстой кишке – к повышению, что отражает сегментспецифичность воздействия ионизирующего излучения на тонкую и толстую кишку.

Трансэпителиальное сопротивление (ТЭС). В тощей кишке трансэпителиальное сопротивление постепенно снижалось в группах «Интактные» (n=24), «Ложно-облученные» (n=16) и «2 Гр» (n=16) в течение 60 минут регистрации в камере Уссинга (рис. 6). У интактных животных регистрировали значения ТЭС к 5-й минуте 76 ± 7 Ом·см², к 60-й минуте -54 ± 5 Ом·см² (рис.6). Процедура ложного

облучения не приводила к изменению ТЭС в тощей кишке; к 5-й минуте значение ТЭС было 74 ± 6 Ом·см², к 60-й минуте – 59 ± 7 Ом·см². Воздействие излучения в дозе 2 Гр также не изменяло значений ТЭС в тощей кишке ни на одном из исследованных промежутков времени; к 5-й минуте ТЭС было равно 80 ± 6 Ом·см², к 60-й минуте 66 ± 5 Ом·см². Облучение в дозе 10 Гр вызывало пятикратное снижение ТЭС в тощей кишке по сравнению с ложно-облученной группой (p<0.001, двухфакторный дисперсионный анализ). К 5-й минуте значение ТЭС в группе «10 Гр» (n=24) было 16 ± 2 Ом·см², к 60-й минуте 18 ± 2 Ом·см². Таким образом, воздействие ионизирующего излучения имело дозо-зависимый эффект на ТЭС в тощей кишке: только облучение в дозе 10 Гр приводило к существенному снижению сопротивления, в то время как доза 2 Гр не изменяла его.

В толстой кишке динамика ТЭС оставалась стабильной во всех исследованных группах (рис.6). У интактных животных (n=24) к 5-й минуте регистрировали значение ТЭС 64 ± 4 Ом·см², к 60-й минуте - 56 ± 5 Ом·см². Процедура ложного облучения не оказывала влияния на значение ТЭС в толстой кишке; в группе «Ложно-облученные» (n=16) к 5-й минуте регистрировали ТЭС 68 ± 6 Ом·см², к 60-й минуте - 52 ± 4 Ом·см². Облучение в дозе 2 Гр также не приводило к изменению ТЭС по сравнению с ложно-облученными особями; к 5-й минуте в группе «2 Гр» (n=16) регистрировали значение 63 ± 4 Ом·см², к 60-й минуте 50 ± 3 Ом·см². Сопротивление значительно снизились в толстой кишке только в группе особей, облученных в дозе 10 Гр, по сравнению с ложно-облученными животными (p<0.01, двухфакторный дисперсионный анализ). В группе «10 Гр» (n=24) к 5-й минуте регистрировали ТЭС 42 ± 2 Ом·см², к 60-й минуте 45 ± 3 Ом·см². Таким образом, в толстой кишке, так же, как и в тощей, проявился дозо-зависимый эффект облучения на ТЭС: только при воздействии в дозе 10 Гр ТЭС было снижено, в то время как доза 2 Гр не вызывала его изменения.

Стоит отметить, что в толстой кишке облучение в дозе 10 Гр привело к снижению ТЭС на 23%, в то время как в тощей кишке при облучении в той же дозе ТЭС снизилось на 76%. Эти результаты свидетельствуют о сегмент-зависимом эффекте ионизирующего излучения уааа барьерные функции кишки и о повышенной радиорезистентности толстой кишки по сравнению с тощей.



Рисунок 6. Трансэпителиальное сопротивление (ТЭС) тощей (а,в) и толстой (б, г) кишки крыс после воздействия ионизирующего излучения

(а,б) Динамика ТЭС в течение регистрации в камере Уссинга.

* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 - группа, облученная в дозе 10 Гр, по сравнению с ложно-облученными животными

Двухфакторный дисперсионный анализ с коррекцией Тьюки; n = 16-24

(в,г) ТЭС к 5-й мин регистрации в камере Уссинга. *p<0.05, *** p<0.001 - группа, облученная в дозе 10 Гр, по сравнению с ложно-облученными животными Однофакторный дисперсионный анализ с коррекцией Тьюки; n=16-24

Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка средней.

Ток «короткого замыкания». Динамика тока «короткого замыкания» в тощей кишке оставалась стабильной в течение 60 минут регистрации в камере Уссинга (рис. 7). У интактных животных (n=24) к 5-й минуте регистрировали значение тока равное 17 ± 2 мкА, к 60-й минуте - 10 ± 2 мкА (рис.7). У ложно-облученных животных (n=16) значение тока «короткого замыкания» в тощей кишке не изменялось по сравнению с интактными животными; к 5-й минуте 18 ± 3 мкA, к 60-й минуте -11 ± 3 2 мкА. Облучение в дозе 2 Гр также не приводило к изменению тока в тощей кишке; к 5-й минуте значение тока в группе «2 Гр» (n=16) было 19 ± 2 мкА, к 60-й минуте 14 ± 2 мкА. В группе животных, подвергнутых воздействию излучения в дозе 10 Гр (n=24), ток в тощей кишке был значительно повышен по сравнению с ложнооблученными особями (p<0.01, двухфакторный дисперсионный анализ) (рис.7). К 5-й минуте регистрации в группе «10 Гр» ток составил 44 ± 11 мкА, к 60-й минуте – 41 ± 12 мкА. Таким образом, в тощей кишке повышение тока «короткого замыкания» носило дозо-зависимый характер: при облучении в дозе 10 Гр ток был значительно повышен, в то время как облучение в дозе 2 Гр не вызывало изменений этого параметра.

В толстой кишке ток «короткого замыкания» оставался стабильным в течение регистрации в камере Уссинга во всех исследованных группах (рис.7). У интактных животных (n=24) к 5-й минуте регистрировали значение тока 19 ± 3 мкА, к 60-й минуте 12 ± 2 мкА. У ложно-облученных животных (n=16) ток не отличался от интактных в течение всей регистрации; к 5-й минуте ток был равен 18 ± 3 мкА, к 60-й - 12 ± 3 мкА. Облучение в дозе 2 Гр (n=16) также не приводило к изменению тока «короткого замыкания» в толстой кишке; к 5-й минуте регистрировали значение 18 ± 4 мкА, к 60-й минуте 17 ± 3 мкА. Облучение в дозе 10 Гр привело к повышению тока «короткого замыкания», которое регистрировали в течение 60 мин в камере Уссинга (p<0.01, двухфакторный дисперсионный анализ) (рис.7); к 5-й минуте ток в группе «10 Гр» (n=24) составил 38 ± 6 мкА, к 60-й минуте 33 ± 6 мкА.

Таким образом, воздействие ионизирующего излучения в дозе 2 Гр не приводило к изменению тока «короткого замыкания» в толстой кишке, в то время как доза 10 Гр вызывала существенное увеличение тока, что в совокупности указывает на дозо-зависимый эффект ионизирующего излучения в этом сегменте.



Рисунок 7. Ток «короткого замыкания» в тощей (а,в) и толстой (б,г) кишке крыс через 72 ч после воздействия ионизирующего излучения

(а,б) Динамика тока «короткого замыкания» в течение регистрации в камере Уссинга

* p<0.05, ** p<0.01 - группа, облученная в дозе 10 Гр, по сравнению с ложнооблученными животными

Двухфакторный дисперсионный анализ с коррекцией Тьюки; n=16-24

(в,г) Ток «короткого замыкания» к 5-й мин регистрации в камере Уссинга

*** p<0.001 - группа, облученная в дозе 10 Гр, по сравнению с ложнооблученными животными

Однофакторный дисперсионный анализ с коррекцией Тьюки; n=16-24

Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка средней.

Стоит отметить, что радиация в дозе 10 Гр оказала сходный эффект на транспортные процессы в толстой и тощей кишке, что отразилось в повышении тока «короткого замыкания» в обоих сегментах.

3.4. Межклеточная проницаемость тощей и толстой кишки крыс для флуоресцеина натрия после воздействия ионизирующего излучения

Известно, что лучевое поражение кишки приводит к повышению межклеточной проницаемости для бактериальных патогенов и дальнейшему сепсису (Shim et al., 2015; Suzuki et al., 2018). Одним из подходов к анализу проницаемости парацеллюлярного барьера является оценка диффузии макромолекулярных соединений, содержащих флуоресцентную метку, таких как FITC-декстран или флуоресцеин натрия. В ходе экспериментов оценка мекжлеточной проницаемости фрагментов кишки в камере Усиинга осуществлялась во время регистрации электрофизиологических характеристик. Полученные результаты демонстрировали, что добавление флуоресцеина натрия в раствор, омывающий мукозную сторону, и продолжительная инкубация ткани в этих условиях не оказывали влияния на трансэпителиальную разность потенциалов, трансэпителиальное сопротивление и ток «короткого замыкания».

Межклеточная проницаемость тощей кишки для флуоресцеина натрия не отличалась в группах интактных (n=24) и ложно-облученных животных (n=16) (2.9 \pm 0.3 см/с·10⁻⁴ и 3.0 \pm 0.2 см/с·10⁻⁴, соответственно, рис.8). 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, р<0.01, однофакторный дисперсионный анализ). Повышение межклеточной проницаемости тощей кишки при облучении в дозе 10 Гр совпадает co снижением поляризации, снижением трансэпителиального сопротивления и повышением тока «короткого замыкания», наблюдаемыми в этой же группе. Полученные результаты указывают на существенное нарушение барьерных и транспортных функций тощей кишки в условиях лучевого поражения в дозе 10 Гр.



Рисунок 8. Проницаемость тощей и толстой кишки для флуоресцеина натрия через 72 ч после облучения

** p<0.01 - группа, облученная в дозе 10 Гр, по сравнению с ложнооблученными животными

Однофакторный дисперсионный анализ с коррекцией Тьюки; n=16-24

Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка средней.

Межклеточная проницаемость толстой кишки для флуоресцеина натрия не отличалась ни в одной из исследованных групп (рис.8).

3.5. Гистологическое строение тощей и толстой кишки после воздействия ионизирующего излучения

полученные у ложно-облученных Срезы тощей кишки, животных (п(количество исследованных срезов)=60) и проанализированные с помощью количественной морфометрии, демонстрировали нормальную структуру типа «крипта-ворсинка» (рис. 9). В группе крыс, облученных в дозе 2 Гр (n=60), было обнаружено достоверное увеличение глубины и ширины крипты, а также диаметра ворсинки тощей кишки по сравнению с ложно-облученными особями (p<0.05, однофакторный дисперсионный анализ) (рис. 9). Облучение в дозе 10 Гр вызвало укорочение ворсинок и увеличение их диаметра по сравнению с ложнооблученными крысами (p<0.05). В этой же группе глубина и диаметр крипт были существенно снижены по сравнению с ложно-облучёнными особями (p<0.05) (рис. 9). Толщина стенки тощей кишки, напротив, увеличивалась при облучении в дозе 10 Гр по сравнению с ложно-облученными крысами за счет утолщения подслизистой основы (р<0.001).

Таким образом, воздействие ионизирующего излучения на морфологию тощей кишки носило дозо-зависимый характер: облучение в дозе 2 Гр оказывало влияние только на слизистую оболочку, в частности на морфологические параметры крипт и ворсинок, в то время как облучение в дозе 10 Гр затрагивало как морфологию ворсинок и крипт, так и подслизистую основу.

Исследование тканей толстой кишки в контрольной группе (n=60) выявило типичное для этого органа строение: слизистая оболочка с многочисленными углублениями – криптами, подслизистая основа из рыхлой соединительной ткани, два слоя гладких мышц и серозная соединительнотканная оболочка (рис. 10). При облучении в дозе 2 Гр (n=60) в толстой кишке произошло увеличение толщины стенки за счет мышечных слоев и соединительнотканной оболочки (p<0.05) (рис. 10). 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



Рисунок 9. Гистологическое строение тощей кишки крыс через 72 ч после воздействия ионизирующего излучения

а) Срезы тощей кишки крысы, окрашенные гематоксилин-эозином. С – крипта, V – ворсинка

б) Морфометрические параметры тощей кишки крыс после облучения, оцененные по результатам гистологического исследования

*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

Однофакторный дисперсионный анализ с коррекцией Тьюки; n=60

Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка средней.


Рисунок 10. Гистологическое строение толстой кишки крыс через 72 ч после облучения

а) Срезы толстой кишки крысы, окрашенные гематоксилин-эозином. С – крипта, V – ворсинка

б) Морфометрические параметры тощей кишки крыс после облучения, оцененные по результатам гистологического исследования

Однофакторный дисперсионный анализ с коррекцией Тьюки

* 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

Однофакторный дисперсионный анализ с коррекцией Тьюки; n=12

Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка средней.

соединительнотканной оболочки (p<0.001, однофакторный дисперсионный анализ) (рис. 10). Полученные данные указывают на дозо-зависимый эффект ионизирующего излучения на морфологию тканей толстой кишки: облучение в дозе 2 Гр не изменяло строения слизистой оболочки, а приводило только к небольшому увеличению стенки кишки за счет мышечных слоев. В это же время облучение в дозе 10 Гр значительно влияло как на структуру крипт толстой кишки, так и на мышечные слои стенки.

Необходимо отметить, что воздействие ионизирующего излучения вызывало изменения разного характера в тощей и толстой кишке: в тощей кишке при облучении в дозе 10 Гр наблюдалось утолщение и укорочение ворсинок и существенное сокращение величины крипт, а также увеличение стенки кишки за счет подслизистой основы. В толстой кишке под действием облучения изменялась глубина, но не диаметр крипт, а стенка увеличивалась за счет мышечного слоев. В совокупности эти данные подтверждают сегмент-зависимое действие ионизирующего излучения на кишечник.

3.6. Анализ уровня белков плотных контактов и активированной каспазы-3 в тощей и толстой кишке после воздействия ионизирующего излучения

В контрольных образцах тощей кишки (n=4) крыс методом Вестерн-блот обнаруживались следующие белки плотных контактов: клаудины-1, -2, окклюдин, трицеллюлин (рис. 11). Воздействие ионизирующего излучения в дозе 2 Гр (n=4) приводило к появлению в тощей кишке клаудина-3, в отличие от ложно-облученных животных, у которых этот белок не идентифицировали (p<0.05, однофакторный дисперсионный анализ) (Рис.11). Остальные белки экспрессировались в группе «2 Гр» так же, как и в ложно-облученной группе. Воздействие ионизирующего излучения в дозе 10 Гр (n=4) приводило к увеличению уровня клаудина-1, -2 и окклюдина, к появлению клаудина-3, -4, а также снижению уровня трицеллюлина в тощей кишке по сравнению с ложно-облученными крысами (p<0.05, однофакторный дисперсионный анализ) (рис. 11).

У контрольных животных в тощей кишке методом Вестерн-блот идентифицировали активированную каспазу-3, что указывает на протекание процессов апоптоза (рис.11). При облучении в дозе 2 Гр уровень активированной

каспазы-3 не изменялся, но достоверно снижался в тощей кишке при облучении в дозе 10 Гр (рис.11).

В толстой кишке в контрольной группе (n=4) методом Вестерн-блот идентифицировали клаудин-1, -2, -3, -4, окклюдин и трицеллюлин (рис.12). 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 клаудина-4 в толстой кишке (рис. 12).

Активированная каспаза-3 идентифицировалась в толстой кишке крыс (рис.12). Воздействие ионизирующего излучения в дозах 2 Гр или 10 Гр не изменяло уровня каспазы-3 в толстой кишке.

Полученные результаты указывают на дозо-зависимый эффект облучения в отношении белков плотных контактов: существенно и разнонаправленно изменились уровни белков в тощей кишке при воздействии ионизирующего излучения в дозе 10 Гр, в то время как доза 2 Гр вызывала повышение только клаудина-3. В это же время в толстой кишке при воздействии облучения в дозе 10 Гр изменились уровни только клаудинов-2 и -4. Эти результаты демонстрируют сегмент-специфичный эффект ионизирующего излучения и показывают, что менее выраженная реакция на облучение толстой кишки сопровождается менее резкой реорганизацией комплексов плотных контактов в этом отделе.



Рисунок 11. Оценка уровня белков плотных контактов, а также активированной каспазы-3 в тощей кишке крыс через 72 ч после облучения

а) Изображения бэндов на оригинальных PVDF мембранах, полученных методом Вестерн-блот

б) Уровень белков, оцененный по результатам анализа денситометрии хемилюминесцентного сигнала от PVDF мембран

*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

Однофакторный дисперсионный анализ с коррекцией Тьюки; n = 4

Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка средней.



Рисунок 12. Оценка уровня белков плотных контактов, а также активированной каспазы-3 в толстой кишке крыс через 72 ч после облучения

a) Уровень белков, оцененный по результатам анализа денситометрии хемилюминесцентного сигнала от PVDF мембран

*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

Однофакторный дисперсионный анализ с коррекцией Тьюки; n = 4

Данные представлены как среднее±стандартная ошибка средней

б) Изображения бэндов на оригинальных PVDF мембранах, полученных методом Вестерн-блот.

ГЛАВА 4. БАРЬЕРНЫЕ ФУНКЦИИ ТОЩЕЙ И ТОЛСТОЙ КИШКИ КРЫС ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ В УСЛОВИЯХ ВВЕДЕНИЯ УАБАИНА

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

У крыс из группы «Контроль» (n=6), которым вводили физиологический раствор, на протяжение всего эксперимента масса тела достоверно не изменялась (рис. 13а). У животных из группы «Радиация 10 Гр» (n=7) масса тела не изменялась вплоть до процедуры облучения на 4-е сутки эксперимента. После воздействия ионизирующего излучения животные теряли вес до окончания эксперимента; на 6-й и 7-й день масса тела в группе «Радиация 10 Гр» была достоверно ниже по сравнению с контролем (p<0.05 и p<0.001, соответственно; двухфакторный дисперсионный анализ) (рис. 13а). Группа «Уабаин» (n=6), которая получала инъекции уабаина и не подвергалась облучению, не отличалась по динамике изменения массы тела от контроля на протяжении всего эксперимента. В группе «Уабаин + Радиация 10 Гр» (n=7) животные получали инъекции уабаина в течение 4-х дней перед облучением, а также следующие два дня. Сразу после процедуры облучения животные в этой группе теряли вес ежедневно; на 6-й и 7-й день масса тела была достоверно ниже, чем в контроле (p<0.01 и p<0.001, соответственно; двухфакторный дисперсионный анализ). Между группами «Радиация 10 Гр» и «Уабаин + Радиация 10 Гр» отличий не было обнаружено ни в один из дней.

Таким образом, предварительное введение уабаина не предотвращало потери массы тела, вызванной воздействием ионизирующего излучения.

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

Концентрация уабаина в сыворотке крови контрольных животных была 0.40 \pm 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 \pm 1.0 нМ и 1.04 \pm 0.30 нМ, соответственно (p<0.05). Сочетанное применение уабаина и облучения в дозе 10 Гр вызывало значительное повышение концентрации (21.2 \pm 6.9 нМ, n=7; p<0.05) уабаина в сыворотке крови крыс (рис.13б).



Рисунок 13. Динамика массы тела животных (а) и концентрация уабаина в сыворотке крови (б) через 72 ч после облучения в экспериментах по воздействию ионизирующего излучения в условиях введения уабаина

p<0.05, ## p<0.01, ### p<0.001 - группа «Радиация 10 Гр» по сравнению с контролем;

** p<0.01, *** p<0.001 - группа «Уабаин + Радиация 10 Гр» по сравнению с контролем;

\$ p<0.05 – группа «Уабаин» по сравнению с контролем;

& p<0.05 – группа «Уабаин + Радиация 10 Гр» по сравнению с группой «Радиация 10 Гр»

а - двухфакторный дисперсионный анализ с коррекцией Тьюки; б – однофакторный дисперсионный анализ с коррекцией Тьюки; n=6-7

Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка средней.

4.3. Электрофизиологические характеристики эпителия тощей и толстой кишки крыс после воздействия ионизирующего излучения в условиях введения уабаина

Трансэпителиальная разность потенциалов. Величина трансэпителиальной разности потенциалов в тощей кишке в контрольной группе (n = 24) постепенно повышалась в течение 60 мин регистрации в камере Уссинга (рис.14). К 5-й минуте в группе «Контроль» зарегистрировали величину -1.6 ± 0.2 мВ, а к 60-й минуте -0.7± 0.2 мВ (рис. 14). Воздействие ионизирующего излучения в дозе 10 Гр привело к снижению поляризации по сравнению с контролем (p<0.05, двухфакторный дисперсионный анализ): в группе «Радиация 10 Гр» (n=28) к 5-й мин регистрации разность потенциалов была равна -0.4 ± 0.1 мВ. К 60-й минуте в группе «Радиация 10 Гp» (n=28)зарегистрировали величину трансэпителиальной разности потенциалов -0.5 ± 0.2 мB, что не отличалось от контрольных значений (рис.14). В группе «Уабаин» разность потенциалов в тощей кишке не отличалась от контроля в течение всей регистрации в камере Уссинга; к 5-й мин регистрации разность потенциалов в этой группе составила -2.2 ± 0.3 мВ; к 60-й мин -1.0 ± 0.1 мВ. В группе «Уабаин + Радиация 10 Гр» (n=28) было выявлено снижение поляризации по сравнению с контролем (р<0.05, двухфакторный дисперсионный анализ); к 5-й минуте регистрации разность потенциалов была равна -0.3 ± 0.1 мВ. К 60-й мин регистрации в группе «Уабаин + Радиация 10 Гр» значение разности потенциалов было -0.3 ± 0.2 мB, что не отличалось от контроля в этот момент времени. Различий в разности потенциалов между группами «Радиация 10 Гр» и «Уабаин + Радиация 10 Гр» в тощей кишке не было выявлено (рис.14). Таким образом, предварительные инъекции уабаина не предотвращали деполяризации, наблюдаемой в тощей кишке при воздействии ионизирующего излучения в дозе 10 Гр.

В толстой кишке динамика трансэпителиальной разности потенциалов в контрольной группе (n = 24) оставалась стабильной в течение регистрации в камере Уссинга (рис. 14); к 5-й минуте значение разности потенциалов составляло -0.7 ± 0.2 мВ; к 60-й минуте регистрации -0.3 ± 0.2 мВ. Воздействие ионизирующего излучения в дозе 10 Гр приводило к повышению поляризации в толстой кишке, наблюдаемому в течение всей регистрации в камере Уссинга (p<0.05,



Рисунок 14. Трансэпителиальная разность потенциалов в тощей (а, в) и толстой (б, г) кишке крыс после воздействия ионизирующего излучения в условиях введения уабаина

(а, б) Динамика разности потенциалов в течение регистрации в камере Уссинга

Двухфакторный дисперсионный анализ с коррекцией Тьюки; n=24-28

(б, г) Трансэпителиальная разность потенциалов к 5-й мин регистрации в камере Уссинга

Однофакторный дисперсионный анализ с коррекцией Тьюки; n = 24-28

p < 0.05 – группа «Радиация 10 Гр» по сравнению с контрольной; * p < 0.05
– группа «Уабаин + Радиация 10 Гр» по сравнению с контрольной; \$ p < 0.05 – группа «Уабаин» по сравнению с контрольной; & p < 0.05 – группа «Уабаин + Радиация 10 Гр» по сравнению с группой «Радиация 10 Гр»

Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка средней.

двухфакторный дисперсионный анализ). В группе «Радиация 10 Гр» (n=28) к 5-й мин регистрировали значение -1.4 ± 0.2 , к 60-й минуте -1.3 ± 0.3 мВ. В группе «Уабаин» (n=24) также наблюдалась повышение поляризации в толстой кишке по сравнению с контролем (p<0.05, двухфакторный дисперсионный анализ) (рис. 14). К 5-й мин в «Уабаин» зарегистрировали значение трансэпителиальной разности группе потенциалов -1.3 \pm 0.2 мВ, к 60-й мин -0.5 \pm 0.2 мВ. В группе «Уабаин + Радиация 10 Гр» (n=28), где воздействие ионизирующего излучения осуществлялось в условиях предварительного введения уабаина, значения разности потенциалов не отличались от контроля в течение всей регистрации в камере Уссинга: к 5-й минуте -0.6 ± 0.2 мВ, к 60-й минуте -0.3 ± 0.3 мВ. В группе «Уабаин + Радиация 10 Гр» наблюдалось достоверное снижение поляризации по сравнению с группой «Радиация 10 Гр» в течение всей регистрации в камере Уссинга (рис. 14). Полученные данные демонстрируют, что предварительные иъекции уабаина предотвращали повышение поляризации, наблюдаемое в толстой кишке при воздействии ионизирующего излучения.

Таким образом, воздействие ионизирующего излучения в дозе 10 Гр приводило к сегмент-зависимым изменениям разности потенциалов: в тощей кишке в группе «Радиация 10 Гр» наблюдалась деполяризация, в то время как в толстой кишке - повышение поляризации в этой же группе. Причем предварительное введение уабаина не предотвращало снижение поляризации в тощей кишке, но компенсировало повышение поляризации в толстой кишке.

Трансэпителиальное сопротивление (ТЭС). Трансэпителиальное сопротивление тощей кишки постепенно снижалось в течение 60 минут регистрации в камере Уссинга в контрольной группе (n=24) (рис.15). К 5-й мин регистрации ТЭС в контроле было 83 ± 8 Ом·см², к 60-й – 59 ± 7 Ом·см². Воздействие излучения в дозе 10 Гр приводило к пятикратному снижению ТЭС по сравнению с контролем (n=28, p<0.001, двухфакторный дисперсионный анализ) (рис.15); к 5-й мин регистрации ТЭС в группе «Радиация 10 Гр» было равно 15 ± 2 Ом·см², к 60-й – 17 ± 2 Ом·см². Введение уабаина не приводило к изменению ТЭС в тощей кишке; к 5-й минуте регистрации в группе «Уабаин» (n=24) значение ТЭС было 98 ± 5 Ом·см², к 60-й – 73 ± 6 Ом·см². В группе «Уабаин + Радиация 10 Гр» (n=28) ТЭС к 5-й минуте было равно 19 ± 2 Ом·см², что также было значительно ниже по сравнению с



Рисунок 15. Трансэпителиальное сопротивление (ТЭС) в тощей (а, в) и толстой (б, г) кишке крыс после воздействия излучения в условиях введения уабаина

(а, б) Динамика ТЭС в течение регистрации в камере Уссинга

p < 0.001, ## p < 0.01, # p < 0.05 – группа «Радиация 10 Гр» по сравнению с контрольной; *** p < 0.001 – группа «Уабаин + Радиация 10 Гр» по сравнению с контрольной; &&& p < 0.001, && p < 0.01, & p < 0.05 – группа «Уабаин + Радиация 10 Гр» по сравнению с 10 Гр» по сравнению с группой «Радиация 10 Гр»

Двухфакторный дисперсионный анализ с коррекцией Тьюки; n = 24-28

(в, г) ТЭС к 5-й мин регистрации в камере Уссинга

p < 0.001– группа «Радиация 10 Гр» по сравнению с контрольной; *** p <
0.001 – группа «Уабаин + Радиация 10 Гр» по сравнению с контрольной; && p < 0.01
– группа «Уабаин + Радиация 10 Гр» по сравнению с группой «Радиация 10 Гр»
Однофакторный дисперсионный анализ с коррекцией Тьюки; n = 24-28
Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка средней

с контролем (p<0.001, двухфакторный дисперсионный анализ). К 60-й минуте значение ТЭС в группе «Уабаин + Радиация 10 Гр» было 19 ± 2 Ом·см², что также значительно ниже, чем в эту же минуту в контроле (p<0.001, двухфакторный дисперсионный анализ). ТЭС не отличалось между группами «Радиация 10 Гр» и «Уабаин + Радиация 10 Гр» в тощей кишке в течение всех 60 мин регистрации (рис.15). Таким образом, предварительное введение уабаина не предотвращало многократного снижения ТЭС в тощей кишке, вызываемого облучением.

В толстой кишке динамика ТЭС оставалась стабильной в течение регистрации в камере Уссинга во всех исследованных группах (рис.15). В контрольной группе (n=24) к 5-й минуте регистрировали значение ТЭС 61 ± 2 Ом·см², к 60-й минуте – 59 ± 7 Ом·см². Воздействие ионизирующего излучения в дозе 10 Гр приводило к снижению ТЭС в толстой кишке (p<0.001). К 5-й минуте регистрации в группе «Радиация 10 Гр» ТЭС было равно 39 ± 3 Ом·см², к 60-й минуте также 39 ± 3 Ом·см². В группе «Уабаин» (n=24), получавшей инъекции уабаина, но не подвергнутой процедуре облучения, к 5-й минуте регистрировали сопротивление 64 ± 4 Ом·см², к 60-й минуте - 73 ± 6 Ом·см² (рис.15), что не отличалось от контрольных значений. Предварительное введение уабаина предотвращало снижение ТЭС, вызванное облучением: ТЭС в толстой кишке в группе «Уабаин + Радиация 10 Гр» (n=28) не отличалось от контроля в течение всей регистрации (рис. 15). К 5-й минуте в этой группе зарегистрировали значение ТЭС 52 ± 3 Ом·см², к 60-й минуте 48 ± 3 Ом·см². Значение ТЭС в толстой кишке в группе «Уабаин + Радиация 10 Гр» было

Таким образом, предварительные инъекции уабаина предотвращали снижение ТЭС, вызываемое воздействием ионизирующего излучения в толстой кишке, но не в тощей кишке.

Ток «короткого замыкания». В тощей кишке ток «короткого замыкания» оставался стабильным в течение 60 минут регистрации в камере Уссинга в группах «Контроль» (n=24), «Радиация 10 Гр» (n=28), «Уабаин + Радиация 10 Гр» (n=28) (рис. 16). В контрольной группе ток к 5-й минуте составлял 22 ± 2 мкА, к 60-й минуте – 27 ± 8 мкА. Воздействие ионизирующего излучения в дозе 10 Гр привело к значительному увеличению тока «короткого замыкания» в тощей кишке; к 5-й



Рисунок 16. Ток «короткого замыкания» в тощей (а, в) и толстой (б, г) кишке крыс после воздействия излучения при введении уабаина

(а, б) Динамика тока «короткого замыкания» в течение регистрации в камере Уссинга

p < 0.05, ## p<0.01 – группа «Радиация 10 Гр» по сравнению с контрольной

& p<0.05 – группа «Уабаин + Радиация 10 Гр» по сравнению с группой «Радиация 10 Гр»

Однофакторный дисперсионный анализ с коррекцией Тьюки; n = 24-28

(б, г) Ток «короткого замыкания» к 5-й мин регистрации в камере Уссинга

p<0.01 – группа «Радиация 10 Гр» по сравнению с контрольной

\$ p<0.05 – группа «Уабаин + Радиация 10 Гр» по сравнению с группой «Радиация 10 Гр»

Однофакторный дисперсионный анализ с коррекцией Тьюки; n = 24-28 Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка средней минуте регистрации в группе «Радиация 10 Гр» значение тока было равно 49 ± 8 мкА, что достоверно выше, чем в контроле (p<0.01, двухфакторный дисперсионный анализ) (рис. 16). К 60-й минуте в группе «Радиация + 10 Гр» ток был равен 47 ± 8 контрольного значения (p<0.05, двухфакторный мкА, что также выше дисперсионный анализ). Введение уабаина не приводило к изменению тока «короткого замыкания» по сравнению с контролем (рис. 16); в группе «Уабаин» (n=24) к 5-й минуте зарегистрировали значение тока 25 ± 3 мкА, к 60-й минуте – 15 ± 2 мкА. В группе «Уабаин + Радиация 10 Гр» к 5-й минуте значение тока 36 ± 7 мкА, а к 60-й минуте – 43 ± 7 мкА. Ток в тощей кишке в группе «Уабаин + Радиация 10 Гр» не отличался ни от контроля, ни от группы «Радиация 10 Гр» (рис. 16). Таким образом, введение уабаина не предотвращало повышения тока «короткого замыкания» в тощей кишке крыс, вызываемого облучением в дозе 10 Гр.

В толстой кишке ток «короткого замыкания» оставался стабильным в течение 60 мин регистрации в камере Уссинга во всех исследованных группах (рис.16). В контрольной группе (n=24) ток составил 17 ± 3 мкА к 5-й минуте регистрации и 14 ± 2 мкА к 60-й минуте (рис. 16). Воздействие ионизирующего излучения в дозе 10 Гр привело к повышению тока «короткого замыкания» по сравнению с контролем (n=28, p<0.05, двухфакторный дисперсионный анализ); к 5-й минуте ток в группе «Радиация 10 Гр» был 37 \pm 6 мкА, к 60-й минуте 26 \pm 5 мкА (рис. 16). В группе «Уабаин» (n=24) ток не отличался от контроля в течение регистрации в камере Уссинга; к 5-й минуте ток в этой группе составил 28 ± 4 мкA, а к 60-й минуте 18 ± 3 мкА. В группе «Уабаин + Радиация 10 Гр» (n=28), которая получала предварительные инъекции уабаина перед облучением, ток «короткого замыкания» не отличался от контроля; к 5-й минуте регистрировали 21 ± 4 мкA, что было достоверно ниже, чем в группе «Радиация + 10 Гр» (р<0.05, двухфакторный дисперсионный анализ). К 60-й минуте регистрации ток в группе «Уабаин + Радиация 10 Гр» был 23 ± 4 мкА, что не отличалось ни от контроля, ни от значения в группе «Радиация + 10 Гр». Полученные данные указывают на то, что инъекции уабаина предотвращали повышение тока короткого замыкания, вызванного облучением, в толстой кишке.

Полученные в результате электрофизиологических экспериментов данные указывают на протективную роль уабаина в отношении действия ионизирующего излучения на барьер толстой кишки. На это указывает предотвращение повышения поляризации, снижения ТЭС и повышения тока «короткого замыкания», вызываемых облучением, в этом сегменте. В тощей кишке уабаин не оказывал протективного воздействия: не обнаружено изменений электрофизиологических параметров между группами «Радиация 10 Гр» и «Уабаин + Радиация 10 Гр».

4.4. Исследование межклеточной проницаемости тощей и толстой кишки крыс для флуоресцеина натрия при воздействия ионизирующего излучения в условиях введения уабаина

Межклеточная проницаемость кишечного барьера была оценена по проникновению флуоресцеина натрия с мукозной на серозную сторону к 60-й минуте регистрации в камере Уссинга. В тощей кишке исходная проницаемость была 2.8 ·10-4 см/с (n=24, рис. 17). Воздействие ионизирующего излучения в дозе 10 Гр привело к двукратному увеличению проницаемости тощей кишки по сравнению с контролем (n=28, p<0.05, однофакторный дисперсионный анализ) (рис.17). 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 в условиях облучения.

Проницаемость для флуоресцеина натрия в толстой кишке при воздействии ионизирующего излучения, уабаина или излучения в комбинации с инъекциями уабаина не менялась по сравнению с контролем (рис. 17).

4.5. Морфометрия ткани тощей и толстой кишки после воздействия ионизирующего излучения в условиях введения уабаина

У животных контрольной группы (n=60) исследование тканей тощей кишки выявило характерное для этого сегмента гистологическое строение с хорошо идентифицируемыми ворсинками и криптами (рис. 18). Применение уабаина и воздействие ионизирующего излучения приводило к многочисленным изменениям



Рисунок 17. Межклеточная проницаемость для флуоресцеина натрия в тощей и толстой кишке крысы при воздействии ионизирующего излучения в условиях введения уабаина

* p < 0.05 – группа «Уабаин + Радиация 10 Гр» по сравнению с контрольной;
p < 0.05 – группа «Радиация 10 Гр» по сравнению с контрольной
Однофакторный дисперсионный анализ с коррекцией Даннетта; n = 24-28
Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка средней



Рисунок 18. Гистологическое строение тощей кишки крыс после воздействия ионизирующего излучения в условиях введения уабаина

а) Контроль, б) Радиация 10 Гр, в) Уабаин, г) Уабаин + Радиация 10 Гр

Окраска гематоксилин-эозином

С – крипта, V – ворсинка

Шкала – 400 мкм.



Рисунок 19. Морфометрические параметры тощей кишки крыс после воздействия ионизирующего излучения в условиях введения уабаина

*p<0.05 – группа «Уабаин + Радиация 10 Гр» по сравнению с контролем
p<0.05, ### p<0.001 - группа «Радиация 10 Гр» по сравнению с контролем
\$ p<0.05 - группа «Уабаин» по сравнению с контролем
Однофакторный дисперсионный анализ с коррекцией Тьюки; n=60
Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка средней.

в строении эпителия. Воздействие ионизирующего излучения в дозе 10 Гр вызывало укорочение ворсинок на 55% и увеличение их диаметра на 43% (n=60, p<0.001 и p<0.05, соответственно; однофакторный дисперсионный анализ). Кроме того, в группе «Радиация 10 Гр» в тощей кишке наблюдалось уменьшение глубины крипт без изменения их диаметра, а также увеличение толщины стенки за счет подслизистой основы (p<0.05, однофакторный дисперсионный анализ). Инъекции уабаина достоверно увеличивали глубину крипты по сравнению с контролем (группа «Уабаин», n=60, p<0.01, однофакторный дисперсионный анализ) (рис. 18, рис. 19). В группе «Уабаин + Радиация 10 Гр» (n=60) морфология тканей тощей кишки и измеренные морфометрические параметры не отличались от группы «Радиация 10 Гр» (рис. 18, рис. 19). Таким образом, предварительное введение уабаина не предотвращало изменения структуры тканей тощей кишки, вызываемого облучением.

Толстая кишка в контрольной группе (n=60) имела типичное строение: складчатая слизистая оболочка содержала трубчатые углубления - крипты. Под слизистой располагались подслизистая основа из рыхлой соединительной ткани, два слоя мышш И соединительнотканная оболочка (рис. 20). Возлействие ионизирующего излучения в дозе 10 Гр вызывало уменьшение глубины крипты на 57% (n=60, p<0.001, однофакторный дисперсионный анализ) и увеличение толщины стенки толстой кишки за счет мышечных слоев и соединительнотканной оболочки (p<0.05, однофакторный дисперсионный анализ) (рис. 20, рис. 21). При этом подслизистая основа не утолщалась в толстой кишке при воздействии излучения, как это наблюдалось в тощей кишке. Воздействие уабаина не вызывало изменений морфологии ткани толстой кишки по сравнению с контролем (группа «Уабаин», n=60) (рис. 20, рис. 21). В группе «Уабаин + Радиация 10 Гр» (n=60) глубина крипты была снижена по сравнению с контролем (p<0.001, однофакторный дисперсионный анализ) (рис. 20, рис. 21). Стоит отметить, что предварительные инъекции уабаина частично компенсировали уменьшение глубины крипты, вызванное облучением: в группе «Уабаин + Радиация 10 Гр» глубина крипты была достоверно больше, чем в группе «Радиация 10 Гр» (p<0.05, однофакторный дисперсионный анализ). Однако уабаин не предотвратил утолщение мышечных слоев, вызываемое воздействием ионизирующего излучения: в группе «Уабаин + Радиация 10 Гр» толщина стенки



Рисунок 20. Гистологическое строение толстой кишки крыс после воздействия излучения в комбинации с инъекциями уабаина

а) Контроль, б) Радиация 10 Гр, в) Уабаин, г) Уабаин + Радиация 10 Гр

Окраска гематоксилин-эозином

С – крипта

Шкала – 400 мкм.



Рисунок 21. Морфометрические параметры толстой кишки крыс после воздействия ионизирующего излучения в условиях предварительного введения уабаина

*p<0.05, *** p<0.001– группа «Уабаин + Радиация 10 Гр» по сравнению с контролем. # p<0.05, ### p<0.001 - группа «Радиация 10 Гр» по сравнению с контролем. & p<0.05 - группа «Уабаин + Радиация 10 Гр» по сравнению с контролем

Однофакторный дисперсионный анализ с коррекцией Тьюки; n=60

Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка средней.

толстой кишки была увеличена по сравнению с контролем за счет мышечных слоев и соединительнотканной оболочки (p<0.05, однофакторный дисперсионный анализ) и не отличалась от группы «Радиация 10 Гр» (рис. 20, рис. 21). Кроме того, инъекции уабаина в сочетании с облучением приводили к увеличению толщины подслизистой основы по сравнению с контролем (p<0.01).

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

Для изучения уровня белков плотных контактов методом Вестерн-блот в эпителии тощей и толстой кишки крысы были выбраны следующие белки: клаудин-1, -2, -3, -4, окклюдин и трицеллюлин. Для оценки интенсивности апоптотической гибели клеток был оценен уровень активированной каспазы-3, протеолитического фермента, играющего центральную роль в исполнении клеточного апоптоза (Marshman et al., 2001; Kiang et al., 2017). Клаудины идентифицировались как белки с молекулярной массой 22–25 кДа, окклюдин и трицеллюлин – 64 кДа, активированная каспаза-3 – 17 кДа (рис. 22, рис. 23, рис. 24, рис. 25).

В тощей кишке крыс группы «Контроль» (n=4) идентифицировались следующие белки плотных контактов: клаудин-1, -2, окклюдин и трицеллюлин (рис. 22, рис. 23). Через 72 ч после воздействия ионизирующего излучения в дозе 10 Гр уровень клаудина-1 и -2 был значительно повышен в тощей кишке по сравнению с контролем (n=4, p<0.05, однофакторный дисперсионный анализ) (рис.22). Кроме того, у животных группы «Радиация 10 Гр» в тощей кишке идентифицировались клаудины-3 и -4, которые не были обнаружены у контрольной группы. Помимо воздействия на белки семейства клаудина, ионизирующее излучение вызывало также повышение уровня окклюдина и снижение трицеллюлина по сравнению с контролем (рис. 23). Введение уабаина не оказывало воздействия на уровень изученных белков в тощей кишке (группа «Уабаин», n=4) (рис. 22, рис. 23). В группе «Уабаин + Радиация 10 Гр» (n=4) результаты Вестерн-блот исследования белков плотных контактов не отличались от полученных в группе «Радиация 10 Гр» (рис.22, рис. 23). Таким образом, уабаин не предотвращал изменения уровня белков плотных контактов, вызываемого облучением, в тощей кишке.



Рисунок 22. Оценка уровня белков семейства клаудина в тощей кишке крыс при воздействии излучения в условиях введения уабаина

а) Изображения бэндов на оригинальных PVDF мембранах, полученных методом Вестерн-блот

б) Уровень белков, оцененный по результатам анализа денситометрии хемилюминесцентного сигнала от PVDF мембран.

p<0.05 – группа «Радиация 10 Гр» по сравнению с контролем

*p<0.05- группа «Уабаин + Радиация 10 Гр» по сравнению с контролем

Однофакторный дисперсионный анализ с коррекцией Тьюки

Данные представлены как среднее±стандартная ошибка средней.



Рисунок 23. Оценка уровня трицеллюлина, окклюдина, а также активированной каспазы-3 в тощей кишке крыс при воздействии излучения в условиях введения уабаина

а) Изображения бэндов на оригинальных PVDF мембранах, полученных методом Вестерн-блот

б) Уровень белков, оцененный по результатам анализа денситометрии хемилюминесцентного сигнала от PVDF мембран

p<0.05 – группа «Радиация 10 Гр» по сравнению с контролем

*p<0.05- группа «Уабаин + Радиация 10 Гр» по сравнению с контролем

Однофакторный дисперсионный анализ с коррекцией Тьюки; n=4

Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка средней.

В тощей кишке животных группы «Контроль» идентифицировалась активированная каспаза-3, что указывает на протекание процессов апоптоза в этом сегменте (рис. 23). Через 72 ч после воздействия ионизирующего излучения в дозе 10 Гр уровень активированной каспазы-3 в тощей кишке существенно снизился по сравнению с контролем (p<0.05, однофакторный дисперсионный анализ) (рис.23). В группе «Уабаин», где животным вводили уабаин без воздействия ионизирующего излучения, уровень активированной каспазы-3 не отличался от контрольного. В группе «Уабаин + Радиация 10 Гр» (n=4) уровень активированной каспазы-3 совпадал с таковым в группе «Радиация 10 Гр». Таким образом, введение уабаина не оказало влияния на снижение уровня каспазы-3, вызванного воздействием ионизирующего излучения.

В толстой кишке в контрольной группе животных (n=4) методом Вестернблот идентифицировали сигнал от следующих белков плотных контактов: клаудин-1, -2, -3, -4, а также окклюдин и трицеллюлин (рис. 24, рис. 25). В группе «Радиация 10 Гр» (n=4) были значительно повышены уровни клаудина-2 и -4 по сравнению с контролем (p<0.05, однофакторный дисперсионный анализ) (рис.24). Введение уабаина без последующего облучения не приводило к изменению уровней белков семейства клаудина (группа «Уабаин», n=4) (рис. 24). В группе «Уабаин + Радиация 10 Гр» (n=4) была повышена экспрессия только клаудина-4 (p<0.05, однофакторный дисперсионный анализ). Стоит отдельно отметить, что в этой группе экспрессия клаудина-2 была значительно ниже по сравнению с группой «Радиация 10 Гр» (p<0.05, однофакторный дисперсионный анализ) (рис. 24) и не отличалась от контрольных значений. Таким образом, предварительные инъекции уабаина предотвращали повышение уровня клаудина-2, вызванного облучением, в толстой кишке.

Уровни окклюдина, трицеллюлина, а также активированной каспазы-3 в толстой кишке не отличались ни в одной из исследованных групп (рис. 25).

4.7. Исследование локализации клаудинов тощей и толстой кишки при воздействия ионизирующего излучения в условиях введения уабаина

Иммунофлуоресцентное исследование было проведено для определения локализации и возможного перераспределения клаудинов плотных контактов.



Рисунок 24. Оценка уровня белков семейства клаудина плотных контактов в толстой кишке крыс при воздействии излучения в условиях введения уабаина

а) Изображения бэндов на оригинальных PVDF мембранах, полученных методом Вестерн-блот

б) Уровень белков, оцененный по результатам анализа денситометрии хемилюминесцентного сигнала от PVDF мембран

p<0.05 – группа «Радиация 10 Гр» по сравнению с контролем

* p<0.05- группа «Уабаин + Радиация 10 Гр» по сравнению с контролем

& p<0.05- группа «Уабаин + Радиация 10 Гр» по сравнению с группой «Радиация 10 Гр»

Однофакторный дисперсионный анализ с коррекцией Тьюки; n=4

Данные представлены как среднее±стандартная ошибка средней.



Рисунок 25. Оценка уровня трицеллюлина, окклюдина, а также активированной каспазы-3 в толстой кишке крыс при воздействии излучения в условиях введения уабаина

а) Изображения бэндов на оригинальных PVDF мембранах, полученных методом Вестерн-блот

б) Уровень белков, оцененный по результатам анализа денситометрии хемилюминесцентного сигнала от PVDF мембран

Однофакторный дисперсионный анализ с коррекцией Тьюки; n=4

Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка средней.

Сигнал в контрольных образцах тощей кишки был обнаружен для клаудина-1, -2 (рис.26). Сигналы от клаудинов -1 и -2 идентифицировались в виде сплошной линии от мембран эпителиоцитов ворсинок. Сигналы от клаудинов-3, -4 не идентифицировались в контрольных образцах тощей кишки. Действие уабаина не вызывало перераспределения белков плотных контактов в пределах ткани тощей кишки. Облучение приводило к существенному изменению сигнала для клаудинов. О реорганизации плотных контактов в группах «Радиация 10 Гр» и «Уабаин + Радиация 10 Гр» свидетельствует исчезновение характерной картины свечения и появление сигнала для клаудинов -1, -2, -3, -4 в виде отдельных точек вместо сплошной линии (рис. 26). Предварительное применение уабаина перед воздействием излучения не восстанавливало картину распределения сигнала, характерную для контрольной группы ни для одного из исследуемых белков.

В толстой кишке сигнал был обнаружен для клаудина-1, -2, -3, -4 (рис. 27). Клаудины локализовались в ткани преимущественно в эпителиоцитах верхней части крипт, обращенной к просвету кишки. Облучение не приводило к дефрагментации плотных контактов в толстой кишке, поскольку сигнал, формирующий сплошную линию вокруг эпителиоцитов, наблюдался в группе «Радиация 10 Гр». В группе «Радиация 10 Гр» интенсивность сигнала от клаудина-2 была выше, чем в контроле, при этом сигнал был распределен равномерно вдоль всей крипты. В группе «Уабаин + Радиация 10 Гр» сигнал от клаудина-2 был менее интенсивным и был сконцентрирован преимущественно в апикальной части крипт, схожим образом с контролем. В группе «Радиация 10 Гр» сигнал от клаудина-4 был более интенсивным по сравнению с контролем, но локализация белка в эпителиоцитах части крипты, обращенной к просвету кишки, сохранялась. В группе «Уабаин + Радиация 10 Гр» характер распределения сигнала от клаудина-4 был похожим на наблюдаемый в группе «Радиация 10 Гр».

Полученные результаты указывают на то, что воздействие ионизирующего излучения приводит к существенной перестройке комплексов плотных контактов в тощей кишке, что отражается в изменении распределения иммунофлуоресцентного сигнала от клаудинов -1, -2, -3, -4. В толстой кишке лучевое воздействие изменяет распределение клаудина-2, что удается частично компенсировать инъекциями уабаина.

	Контроль	Радиация 10 Гр	Уабаин	Уабаин + Радиация 10 Гр
Клаудин-1				
Клаудин-2				
Клаудин-3				
Клаудин-4				5 <u>0 мк</u> м

Рисунок 26. Распределение клаудинов-1, -2, -3, -4 в тощей кишке крыс при воздействии ионизирующего излучения в условиях введения уабаина

Зеленое свечение — клаудины; синее свечение — окраска ядер флуоресцентным красителем DAPI

Масштабная линейка- 50 мкм.



Рисунок 27. Распределение клаудинов-1, -2, -3, -4 в толстой кишке крыс при воздействии ионизирующего излучения в условиях введения уабаина

Зеленое свечение — клаудины; синее свечение — окраска ядер флуоресцентным красителем DAPI

Масштабная линейка- 50 мкм.

ОБСУЖДЕНИЕ

Ионизирующее излучение оказывает повреждающее воздействие на все системы органов, в том числе на желудочно-кишечный тракт. Воздействие ионизирующего излучения в дозах, превышающих 6 Гр, приводит к развитию острого радиационного желудочно-кишечного синдрома (GIARS), смертельному и неизлечимому 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 разнообразных 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 межклеточной проницаемости тощей и толстой кишки. Однако при отсутствии функциональных изменений со стороны ЖКТ в ответ на облучение в дозе 2 Гр наблюдались изменения на тканевом и молекулярном уровне в тощей кишке: изменилась глубина и диаметр крипт, увеличился уровень клаудина-3. 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 в дозах, не способных вызвать развитие GIARS. Клаудин-3 ассоциирован сегментами характеризующимися с кишки, повышенными барьерными свойствами; в этой связи клаудин-3 относят к «уплотняющим» клаудинам плотных контактов. Тем не менее, в последнее время становится известно о его неканонических функциях. Например, уровень кладина-3 повышен в участках метаплазии кишечного эпителия по сравнению с нормальным ворсинчатым эпителием, и экспрессия клаудина-3 была ассоциирована со степенью пролиферации эпителиальных клеток (Okugawa et al., 2012). Нокдаун по клаудину-3 стимулировал апоптоз и снижал экспрессию Bcl-2 в клетках сетчатки (Cao et al., 2021). Вероятнее всего, доза 2 Гр не вызывала физиологических изменений барьерных функций кишки по причине того, что такая дозовая нагрузка приводит к нефатальному потенциально репарируемому повреждению ДНК. Арест клоногенных клеток крипт при такой дозовой нагрузке непродолжительный, после него происходит репаративная пролиферация, дно крипты не опустошается, пул диффренцированных эпителиоцитов не истощается, и денудация ворсинки не происходит (Potten, Grant, 1998). В таких условиях повышение уровня клаудина-3 может быть связано с его неканонической функцией модулятора клеточной пролиферации, а не с его участием в регуляции проницаемости кишечного эпителия. Облучение в дозе 10 Гр приводило к существенному нарушению барьерных функций, повышению проницаемости (только в тощей кишке), повреждению гистологической 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 существенному 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, а также видимому повреждению 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; обнаруживалось изменение морфометрических параметров крипт и толщины мышечных слоев стенки без повреждения подслизистой основы. В толстой кишке при облучении повышались уровни только клаудина -2, -4 из всех исследованных белков. Полученные результаты указывают на значительное различие тощей и толстой кишки по степени радиочувствительности, опосредованное разным молекулярным составом и разной степенью реорганизации комплексов плотных контактов при облучении.

Отдельно стоит обсудить результаты исследования уровня активированной каспазы-3 при воздействии облучения. Каспаза-3 является членом семейства цистеиновых протеаз, способных опосредовать расщепление белков-мишеней. Как и другие каспазы, каспаза-3 существует в виде неактивного зимогена (прокаспазы), который подвергается активации путем разрезания посредством каспаз-8 и -9 (Janicke et al., 1998). Разрезание каспазы-3 и запуск нижележащих механизмов каскада апоптоза активируется широким спектром внешних и внутренних факторов, в том числе, при воздействии ионизирующего излучения (Marshman et al., 2001). Воздействие радиации, так же, как и другие цитотоксические агенты и мутагены, вызывает значительное повышение уровня спонтанного апоптоза в криптах тонкой кишки, с максимумом через 3-6 ч после облучения (Potten, Grant, 1998). В данной работе облучение в дозе 10 Гр, лежащей в диапазоне доз, вызывающих GIARS, приводило к снижению уровня активированной каспазы-3 через 72 ч после облучения в тонкой, но не толстой кишке. Поскольку максимальная интенсивность апоптоза клоногенных клеток крипт наблюдается в течение первых суток после облучения, к третьим суткам после облучения наблюдается либо переход к пролиферации в случае наличия возможности репарировать полученные повреждения ДНК, либо гибель делившихся клеток и опустошение дна крипт. Учитывая гистологическое строение сегментов кишки, можно предположить, что в толстой кишке к третьим суткам происходит частичное восстановление репарации, пула эпителиоцитов и исходного соотношения пролиферации и апоптоза. Одновременно в тощей кишке наблюдается гибель клоногенных клеток крипт, постепенное оголение ворсинки и снижение клеточного пула эпителиоцитов, в связи

с чем интенсивность апоптоза и уровня активированной каспазы-3 значительно снижается через 72 ч после облучения.

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 сопротивления трансэпителиального предотвращало снижение (барьерные свойства) и тока «короткого замыкания» (транспортные свойства) толстой кишки, частично компенсировало уменьшение глубины крипты, вызванное воздействием излучения в дозе 10 Гр. Указанные эффекты сопровождались предотвращением повышения уровня и перераспределения клаудина-2, наблюдаемого в толстой кишке при облучении. Функциональная связь между Na,K-АТФазой и белками плотных контактов описана ранее. Некоторые данные свидетельствуют о том, что Na,K-АТФаза играет роль в транспорте через эпителиальный барьер, регулируя структуру и проницаемость плотных контактов (Rajasekaran, Rajasekaran, 2009). Согласно Rajasekaran и соавт., один из этапов перемещения клаудинов к плазматической мембране в ходе сборки комплекса плотных контактов опосредован полимеризацией актина, которая регулируется Na,K-ATФазой (Rajasekaran et al., 2003). Позднее появились данные о том, что механизм изменения молекулярного состава плотных контактов при модуляции активности Na,K-АТФазы опосредован активацией с-Src-EGFR-Erk1/2 сигнального пути (Tian et al., 2006; Sabath et al., 2008; Rajamanickam et al., 2017). Конкретные механизмы регуляции уровня клаудинов плотных контактов за счет модуляции активности Na,K-ATФазы уабаином предстоит изучить. В данной работе впервые показано, что в условиях радиационного воздействия уабаин оказывает протективное воздействие на барьерные свойства толстой, но не тощей кишки крысы, предотвращая повышение уровня клаудина-2. Применение уабаина может иметь высокий терапевтический потенциал при лечении локального лучевого поражения толстой кишки.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о дозо- и сегментзависимом 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 ионизирующим 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 молекулярного состава и 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 0 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 ЛИТЕРАТУРЫ

Гребенюк А. Н. Основы радиобиологии и радиационной медицины: учебное пособие / А. Н. Гребенюк, О. Ю. Стрелова, В. И. Легеза [и др.]. – 2-е изд., испр. и доп.. – СПб.: Фолиант, 2015. – 232 с.

Исамов Н. Н. Об оценке радиационного воздействия и влиянии скрытой патологии на течение острой лучевой болезни у сельскохозяйственных животных / Н.Н. Исамов //Сельскохозяйственная биология. – 2010. – Т.45. – №.
 4. – С. 38-44.

 Козина Ю. В. Роль радиопротекторов и иммунотропов в профилактике лучевых реакций и осложнений / Ю. В. Козина, Р. А. Зуков, Е. В. Слепов, Е. В. Козина //Эффективная фармакотерапия. – 2021. – V.17. – N. 2. – Р. 50-57.

 Костеша Н. Я. Кишечная форма лучевой болезни и роль поражения желудка в ее развитии / Н. Я. Костеша, Н. Г. Даренская – Томск: Изд-во Томского Ун-та, 1990 – 130 с.

 Марков А. Г. Белки Плотных Контактов Клаудины: Молекулярное Звено Парацеллюлярного Транспорта / А. Г. Марков. – Текст: электронный // Российский Физиологический Журнал Им. И.м. Сеченова. – 2013. – V.99. – Белки Плотных Контактов Клаудины. – №. 2.

Проскуряков С. Я. Стволовые клетки кишечного эпителия.
 Механизмы выживаемости и роль микробиоты / С. Я. Проскуряков, А.Г.
 Коноплянников, Л.П. Ульянова [и др.] // Биомедицинская химия. – 2009. – Т.55.
 – №. 5. – С. 587-609.

7. Пятченков М. О. Структурно-функциональные нарушения кишечного барьера и хроническая болезнь почек. Обзор литературы. Часть І / М.О. Пятченков, А. Г. Марков, А. Ш. Румянцев // Нефрология. – 2022. – Т.26. – № 1. – С. 10-26.

8. Фальчук Е. Л. Изучение барьерных характеристик эпителия Пейеровых бляшек крысы / Е.Л. Фальчук, А.Г. Марков // Вестник Санкт-Петербургского университета. Серия 3. Биология. – 2015. – Вып. 3. – Р. 75-86.

9. Шарапов И. Ю. Функциональная морфология бокаловидных клеток тонкой кишки при действии различных факторов / И. Ю. Шарапов, А.
Г. Кварацхелиия, М. Б. Болгучева, К. Н. Коротких // Журнал анатомии и гистопатологии. – 2021. – Т. 10. – №. 2. – Р. 73-79.

Abed A. Connexins in renal endothelial function and dysfunction / A.
 Abed, J. C. Dussaule, J. J. Boffa [et al.] // Cardiovascular & Haematological Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Cardiovascular & Hematological Disorders). – 2014. – V.14. – N. 1. – P. 15-21.

Alexandre M. D. Overexpression of claudin-7 decreases the paracellular Cl–conductance and increases the paracellular Na+ conductance in LLC-PK1 cells / M. D. Alexandre, Q. Lu, Y. H. Chen // Journal of cell science. – 2005. – V.118. – N. 12. – P. 2683-2693.

 Alexandre M. D. The first extracellular domain of claudin-7 affects paracellular Cl– permeability / M. D. Alexandre, B. G. Jeansonne, R. H. Renegar [et al.] // Biochemical and biophysical research communications. – 2007. – V.357. – N. 1. – P. 87-91.

13. Amasheh S. Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells / S. Amasheh, N. Meiri, A. H. Gitter [et al.] // Journal of cell science. – 2002. – T. 115. – №. 24. – C. 4969-4976.

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. – 2011. – V.201. – N. 1. – P. 133-140.

 Amasheh S. Inflamed pouch mucosa possesses altered tight junctions indicating recurrence of inflammatory bowel disease / S. Amasheh, S. Dullat, M. Fromm [et al.] // International journal of colorectal disease. – 2009. – V.24. – P. 1149-1156.

16. Arystarkhova E. Beneficial renal and pancreatic phenotypes in a mouse deficient in FXYD2 regulatory subunit of Na,K-ATPase / E. Arystarkhova // Frontiers in Physiology. – 2016. – V.7. – P. 88.

17. Assimakopoulos S. F. Effect of bombesin and neurotensin on gut barrier function in partially hepatectomized rats / S. F. Assimakopoulos, I. H. Alexandris, C. D. Scopa [et al.] // World Journal of Gastroenterology. -2005. - V.11. - N. 43. - P. 6757.

18. Athanassiou H. Protective effect of amifostine during fractionated radiotherapy in patients with pelvic carcinomas: results of a randomized trial / H. Athanassiou, D. Antonadou, N. Coliarakis [et al.] // International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics. – 2003. – V.56. – N. 4. – P. 1154-1160.

Bacon C. G. The impact of cancer treatment on quality of life outcomes for patients with localized prostate cancer / C. G. Bacon, E. Giovannucci, M. Testa [et al.] // The Journal of urology. – 2001. – V.166. – N. 5. – P. 1804-1810.

20. Bacon C. G. The association of treatment-related symptoms with quality-of-life outcomes for localized prostate carcinoma patients / C. G. Bacon, E. Giovannucci, M. Testa [et al.] // Cancer. -2002. - V.94. - N. 3. - P. 862-871.

 Banerjee M. SH2 ligand-like effects of second cytosolic domain of Na/K-ATPase α1 subunit on Src kinase / M. Banerjee, Q. Duan, Z. Xie //PloS one. –
 2015. – V.10. – N. 11. – P. e0142119.

22. Baradaran-Ghahfarokhi M. Evaluation of the Effects of Prostate Radiation Therapy on Occludin Expression and Ultrasonography Characteristics of the Bladder / M. Baradaran-Ghahfarokhi, A. Amouheidari, D. Shahbazi-Gahrouei [et al.] // International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics. – 2017. – T. 99. – No. 4. – C. 963-971.

23. 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 [et al.] // Journal of Biological Chemistry. – 2003. – V.278. – N. 14. – P. 11916-11924.

24. Bayley A. J. A randomized trial of supine vs. prone positioning in patients undergoing escalated dose conformal radiotherapy for prostate cancer / A. J. Bayley, C. N. Catton, T. Haycocks [et al.] // Radiotherapy and oncology. -2004. - V.70. - N. 1. - P. 37-44.

25. Bischoff S. C. Intestinal permeability–a new target for disease prevention and therapy / S. C. Bischoff, G. Barbara, W. Buurman [et al.] // BMC gastroenterology. – 2014. – V.14. – C. 1-25.

26. Blanco G. Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function / G. Blanco, R. W. Mercer //American Journal of Physiology-Renal Physiology. – 1998. – V.275. – N. 5. – P. F633-F650.

27. Blazer-Yost B. L. Following Ussing's legacy: from amphibian models to mammalian kidney and brain / B. L. Blazer-Yost //American Journal of Physiology-Cell Physiology. – 2022. – V.323. – N. 4. – P. C1061-C1069.

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 [et al.] // Current Pediatrics. – 2013. – V.12. – N 2. – P. 12-19.

29. Burdelya L. G. An agonist of toll-like receptor 5 has radioprotective activity in mouse and primate models / L. G. Burdelya, V. I. Krivokrysenko, T. C. Tallant [et al.] // Science. – 2008. – V.320. – N. 5873. – P. 226-230.

30. Bürgel N. Mechanisms of diarrhea in collagenous colitis / N. Bürgel,
C. Bojarski, J. Mankertz [et al.] // Gastroenterology. – 2002. – V.123. – N. 2. – P.
433-443.

31. Cameron S. Radiation-induced damage in different segments of the rat intestine after external beam irradiation of the liver / S. Cameron, A. Schwartz, S. Sultan [et al.] // Experimental and molecular pathology. – 2012. – V.92. – N. 2. – P. 243-258.

32. Cao D. The effect of AAV-mediated downregulation of Claudin-3 on the development of mouse retinal vasculature / D. Cao, J. Li, X. Wang [et al.] // Experimental Eye Research. – 2021. – N.213. – P.108836.

33. Castellano P., Eugenin E. A. Regulation of gap junction channels by infectious agents and inflammation in the CNS / P. Castellano, E. A. Eugenin // Frontiers in Cellular Neuroscience. – 2014. – V.8. – P. 122.

34. Chakraborty S. E-cadherin differentially regulates the assembly of connexin43 and connexin32 into gap junctions in human squamous carcinoma cells /
S. Chakraborty, S. Mitra, M. M. Falk [et al.] // Journal of Biological Chemistry. –
2010. – V.285. – N. 14. – P. 10761-10776.

35. Cho Y. Tricellulin secures the epithelial barrier at tricellular junctions by interacting with actomyosin / Y. Cho, D. Haraguchi, K. Shigetomi [et al.] // Journal of Cell Biology. $-2022. - T. 221. - N_{\odot}. 4. - C. e202009037.$

36. Clarke L. L. A guide to Ussing chamber studies of mouse intestine /
L. L. Clarke //American journal of physiology-gastrointestinal and liver physiology.
- 2009. - V.296. - N. 6. - P. G1151-G1166.

37. Claude P. Fracture faces of zonulae occludentes from" tight" and"
leaky" epithelia / P. Claude, D. A. Goodenough //The Journal of cell biology. – 1973.
- V.58. – N. 2. – P. 390-400.

38. 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. – V.8. – P. 371.

39. Coyne C. B. Role of claudin interactions in airway tight junctional permeability / C. B. Coyne, T. M. Gambling, R. C. Boucher [et al.] // American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology. – 2003. – V.285. – N. 5. – P. L1166-L1178.

40. Cui X. Protein interaction and Na/K-ATPase-mediated signal transduction / X. Cui, Z. Xie // Molecules. – 2017. – V.22. – N. 6. – P. 990.

41. Damman C. J., Surawicz C. M. The gut microbiota: a microbial arsenal protecting us from infectious and radiation-induced diarrhea / C. J. Damman,
C. M. Surawicz // Gastroenterology. – 2009. – V.136. – N. 2. – P. 722-724.

42. Daugherty B. L. Regulation of heterotypic claudin compatibility / B.
L. Daugherty, C. Ward, T. Smith [et al.] // The Journal of Biological Chemistry. –
2007. – V.282. – N 41. – P. 30005-30013.

43. Daulagala A. C. E-cadherin beyond structure: a signaling hub in colon homeostasis and disease / A. C. Daulagala, M. C. Bridges, A. Kourtidis // International journal of molecular sciences. – 2019. – V.20. – N. 11. – P. 2756.

44. Dbouk H. A. Connexins: a myriad of functions extending beyond assembly of gap junction channels / H. A. Dbouk, R. M. Mroue, M. E. El-Sabban, R. S. Talhouk // Cell Communication and signaling. – 2009. – V.7. – P. 1-17.

45. Deluco B. Localization of Claudin-3 and Claudin-4 within the Small Intestine of newborn piglets / B. Deluco, K. R. Fourie, O. M. Simko, H. L. Wilson // Physiological Reports. – 2021. – V.9. – N. 3. – P. e14717.

46. Devarajan P. Ankyrin binds to two distinct cytoplasmic domains of Na,K-ATPase alpha subunit / P. Devarajan P., D. A. Scaramuzzino, J. S. Morrow // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1994. – V.91. – N. 8. – P. 2965-2969.

47. DeVita V. T., Lawrence T. S., Rosenberg S. A. (ed.). DeVita, Hellman, and Rosenberg's cancer: principles & practice of oncology. – Lippincott Williams & Wilkins, 2008. – V.2.

48. 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.
- 2015. – V.405. – P. 1-13.

49. Dubois A. Prospects for management of gastrointestinal injury associated with the acute radiation syndrome / A. Dubois, R. I. Walker // Gastroenterology. -1988. - V.95. - N. 2. - P. 500-507.

50. Duerkop B. A. A composite bacteriophage alters colonization by an intestinal commensal bacterium / B. A. Duerkop, C. V. Clements, D. Rollins [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2012. – V.109. – N. 43. – P. 17621-17626.

51. Eckelhoefer H. A. Claudin-4: Functional studies beyond the tight junction / H. A. Eckelhoefer, T. E. Rajapaksa, J. Wang [et al.] // Claudins: Methods and Protocols. – 2011. – C. 115-128.

52. El-Ghazaly M. A. Protective effect of the herbal preparation, STW 5, against intestinal damage induced by gamma radiation in rats / M. A. El-Ghazaly, R. M. El-Hazek, M. T. Khayyal //International Journal of Radiation Biology. – 2015. – V.91. – N. 2. – P. 150-156.

53. Elliott T. B. Gastrointestinal acute radiation syndrome in Göttingen minipigs (Sus scrofa domestica) / T. B. Elliott, N. E. Deutz, J. Gulani [et al.] // Comparative medicine. – 2014. – V.64. – N. 6. – P. 456-463.

54. Empey L. R. Mucosal protective effects of vitamin E and misoprostol during acute radiation-induced enteritis in rats / L. R. Empey, J. D. Papp, L. D. Jewell, R. N. Fedorak // Digestive diseases and sciences. – 1992. – V.37. – N. 2. – P. 205-214.

55. Farquhar M. G. Junctional complexes in various epithelia / M. G.
Farquhar, G. E. Palade // The Journal of cell biology. – 1963. – V.17. – N. 2. – P.
375-412.

56. Flemming S. Desmocollin-2 promotes intestinal mucosal repair by controlling integrin-dependent cell adhesion and migration / S. Flemming, A. C. Luissint, D. H. Kusters [et al.] //Molecular Biology of the Cell. – 2020. – V.31. – N. 6. – P. 407-418.

57. France M. M. The mucosal barrier at a glance / M. M. France, J. R. Turner //Journal of Cell Science. – 2017. – V.130. – N. 2. – P. 307-314.

58. Franchi L. NLRC4-driven production of IL-1 β discriminates between pathogenic and commensal bacteria and promotes host intestinal defense / L. Franchi, N. Kamada, Y. Nakamura [et al.] // Nature immunology. – 2012. – V.13. – N. 5. – P. 449-456.

59. Fredriksson K. Proteomic analysis of proteins surrounding occludin and claudin-4 reveals their proximity to signaling and trafficking networks / K. Fredriksson, C. M. Van Itallie, A. Aponte [et al.] // PloS one. – 2015. – V. 10. – N. 3. – P. e0117074.

60. Freeman L. Radiation-induced acute intestinal inflammation differs following total-body versus abdominopelvic irradiation in the ferret / L. Freeman, M. Hossain, S. W. MacNaughton // International journal of radiation biology. -2001. -V.77. - N. 3. - P. 389-395.

61. Fu Q. The effect of phytic acid on tight junctions in the human intestinal Caco-2 cell line and its mechanism / Q. Fu, H. Wang, M. Xia [et al.] // European Journal of Pharmaceutical Sciences. -2015. - V.80. - P. 1-8.

62. 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 [et al.] // Journal of Histochemistry & Cytochemistry. - 2006. - V.54. - N. 8. - P. 933-944.

63. Fujita H. Tight junction proteins claudin-2 and-12 are critical for vitamin D-dependent Ca2+ absorption between enterocytes / H. Fujita, K. Sugimoto, S. Inatomi [et al.] // Molecular biology of the cell. – 2008. – V.19. – N. 5. – P. 1912-1921.

64. 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 [et al.] // The Journal of Cell Biology. – 1998. – V.141. – Claudin-1 and -2. – N. 7. – P. 1539-1550.

65. 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 [et al.] // The Journal of cell biology. – 2002. – V.156. – N. 6. – P. 1099-1111.

66. 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. $-1999. - T. 147. - N_{\odot}. 4. - C. 891-903.$

67. Furuse M. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions / M. Furuse, T. Hirase, M. Itoh [et al.] // The Journal of Cell Biology.
– 1993. – V.123. – Occludin. – N 6 Pt 2. – P. 1777-1788.

68. Gable M. E. Digitalis-induced cell signaling by the sodium pump: on the relation of Src to Na+/K+-ATPase / M. E. Gable, S. L. Abdallah, S. M. Najjar [et al.] // Biochemical and biophysical research communications. – 2014. – V.446. – N. 4. – P. 1151-1154.

69. Gallagher M. J. A prospective study of treatment techniques to minimize the volume of pelvic small bowel with reduction of acute and late effects associated with pelvic irradiation / M. J. Gallagher, H. D. Brereton, R. A. Rostock [et al.] // International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics. – 1986. – V.12. – N. 9. – P. 1565-1573.

Garg S. Segmental differences in radiation-induced alterations of tight junction-related proteins in non-human primate jejunum, ileum and colon / S. Garg, J. Zheng, J. Wang [et al.] // Radiation research. – 2016. – V.185. – N. 1. – P. 50-59.

Garty H. Role of FXYD proteins in ion transport / H. Garty, S. J. D.
Karlish // Annu. Rev. Physiol. – 2006. – V.68. – P. 431-459.

Gillor O. Persistence of colicinogenic Escherichia coli in the mouse gastrointestinal tract / O. Gillor, I. Giladi, M. A. Riley // BMC microbiology. – 2009.
 – V.9. – P. 1-7.

73. Golden W. C. Low-dose ouabain protects against excitotoxic apoptosis and up-regulates nuclear Bcl-2 in vivo / W. C. Golden, L. J. Martin // Neuroscience. – 2006. – V.137. – N. 1. – P. 133-144.

74. Goldstein F. Treatment of chronic radiation enteritis and colitis with salicylazosulfapyridine and systemic corticosteroids / F. Goldstein, J. Khoury, J. J. Thornton // American Journal of Gastroenterology (Springer Nature). – 1976. – V.65. – N. 3.

75. González-Mariscal L. Crosstalk of tight junction components with signaling pathways / L. González-Mariscal, R. Tapia, D. Chamorro // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes. – 2008. – V.1778. – N. 3. – P. 729-756.

76. Gross A. Desmoglein 2, but not desmocollin 2, protects intestinal epithelia from injury / A. Gross, L. A. Pack, G. M. Schacht [et al.] // Mucosal immunology. – 2018. – V.11. – N. 6. – P. 1630-1639.

77. Gu J. At what dose can total body and whole abdominal irradiation cause lethal intestinal injury among C57BL/6J mice? / J. Gu, Y. Z. Chen, Z. X. Zhang [et al.] //Dose-Response. – 2020. – V. 18. – N. 3. – P. 1559325820956783.

78. Gumbiner B. M. Breaking through the tight junction barrier / B. M.
Gumbiner // The Journal of cell biology. – 1993. – V.123. – N. 6 Pt 2. – P. 1631-1633.

 Gunter-Smith P. J. Gamma radiation affects active electrolyte transport by rabbit ileum: basal Na and Cl transport / P. J. Gunter-Smith //American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology. – 1986. – V.250. – N. 4. – P. G540-G545.

80. 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.

81. Günzel D., Yu A. S. L. Claudins and the modulation of tight junction permeability / D. Günzel, A. S. L. Yu // Physiological reviews. – 2013. – V.93. – N.
2. – P. 525-569.

82. Guo P. Study of penetration mechanism of labrasol on rabbit cornea
by Ussing chamber, RT-PCR assay, Western blot and immunohistochemistry / P.
Guo, N. Li, L. Fan [et al.] // Asian Journal of Pharmaceutical Sciences. – 2019. –
V.14. – N. 3. – P. 329-339.

83. Gupta R. An Amino Acid–Based Oral Rehydration Solution Regulates Radiation-Induced Intestinal Barrier Disruption in Mice / R. Gupta, L. Yin, A. Grosche [et al.] // The Journal of Nutrition. – 2020. – V.150. – N. 5. – P. 1100-1108.

84. Haas M. Involvement of Src and epidermal growth factor receptor in the signal-transducing function of Na+/K+-ATPase / M. Haas, A. Askari, Z. Xie // Journal of Biological Chemistry. – 2000. – V.275. – N. 36. – P. 27832-27837.

Harb A. H. Radiation enteritis / A. H. Harb, C. Abou Fadel, A. I.
 Sharara // Current gastroenterology reports. – 2014. – V.16. – P. 1-9.

86. Hensley M. L. American Society of Clinical Oncology 2008 clinical practice guideline update: use of chemotherapy and radiation therapy protectants / M.
L. Hensley, K. L. Hagerty, T. Kewalramani [et al.] // Journal of clinical oncology. – 2009. – V.27. – N. 1. – P. 127-145.

87. Hicks D. A. Claudin-4 activity in ovarian tumor cell apoptosis resistance and migration / D. A. Hicks, C. E. Galimanis, P. G. Webb [et al.] // BMC cancer. – 2016. – N. 16. – P. 1-11.

88. Hnasko T. S. The western blot / T. S. Hnasko, R. M. Hnasko // ELISA:
Methods and Protocols. – 2015. – P. 87-96.

89. Hogan S. P. Resistin-like molecule β regulates innate colonic function: barrier integrity and inflammation susceptibility / S. P. Hogan, L. Seidu, C. Blanchard [et al.] // Journal of allergy and clinical immunology. – 2006. – V. 118. – N. 1. – P. 257-268.

90. Holmes J. L. Claudin profiling in the mouse during postnatal intestinal development and along the gastrointestinal tract reveals complex expression patterns / J. L. Holmes, C. M. Van Itallie, J. E. Rasmussen, J. M. Anderson // Gene Expression Patterns. – 2006. – V.6. – N. 6. – P. 581-588.

91. Holthöfer B. Structure and function of desmosomes / B. Holthöfer, R.
Windoffer, S. Troyanovsky, R. E. Leube // International review of cytology. – 2007.
– V.264. – P. 65-163.

92. 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. – 2010. – V. 107. – N. 42. – P. 18010-18015.

93. Hou J. Paracellin-1 and the modulation of ion selectivity of tight junctions / J. Hou, D. L. Paul, D. A. Goodenough // Journal of cell science. – 2005. – V.118. – N. 21. – P. 5109-5118.

94. Hou J. Study of claudin function by RNA interference / J. Hou, A. S.
Gomes, D. L. Paul, D. A. Goodenough // Journal of Biological Chemistry. – 2006. –
V. 281. – N. 47. – P. 36117-36123.

95. Howarth G. S. Effects of insulin-like growth factor-I administration on radiation enteritis in rats / G. S. Howarth, R. Fraser, C. L. Frisby [et al.] // Scandinavian journal of gastroenterology. – 1997. – V. 32. – N. 11. – P. 1118-1124.

96. Hua G. Distinct Levels of Radioresistance in Lgr5+ Colonic Epithelial Stem Cells versus Lgr5+ Small Intestinal Stem CellsLgr5+ CESCs Are Resistant to Mitotic Cell Death / G. Hua, C. Wang, Y. Pan [et al.] // Cancer research. – 2017. – V.77. – N. 8. – P. 2124-2133.

97. Huang W. Proteomic evaluation of the acute radiation syndrome of the gastrointestinal tract in a murine total-body irradiation model / W. Huang, J. Yu, J. W. Jones [et al.] // Health physics. – 2019. – V. 116. – N. 4. – P. 516.

98. Iimura M. Cathelicidin mediates innate intestinal defense against colonization with epithelial adherent bacterial pathogens / M. Iimura, R. L. Gallo, K. Hase McDonald [et al.] //The journal of immunology. – 2005. – V.174. – №. 8. – P. 4901-4907.

99. 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 [et al.] // Journal of cell science. – 2006. – V.119. – N. 9. – P. 1781-1789.

100. Ikenouchi J. Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells / J. Ikenouchi, M. Furuse, K. Furuse [et al.] // The Journal of Cell Biology. – 2005. – V.171. – N. 6. – P. 939-945.

101. 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. – V.78. – N. 12. – P. 849-855.

102. Itoh M. Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins / M. Itoh, M. Furuse, K. Morita [et al.] //The Journal of cell biology. – 1999. – V. 147. – N. 6. – P. 1351-1363.

103. Jahraus C. D. Prevention of acute radiation-induced proctosigmoiditis by balsalazide: a randomized, double-blind, placebo controlled trial in prostate cancer patients / C. D. Jahraus, D. Bettenhausen, U. Malik [et al.] // International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics. – 2005. – V.63. – N. 5. – P. 1483-1487.

104. Jalili-Firoozinezhad S. Modeling radiation injury-induced cell death and countermeasure drug responses in a human Gut-on-a-Chip / S. Jalili-Firoozinezhad, R. Prantil-Baun, A. Jiang [et al.] // Cell death & disease. – 2018. – V.9. – N. 2. – P. 223.

105. Janicke R.U. Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis / R.U. Janicke, M. L. Sprengart, M. R. Wati, A. G. Porter // Journal of Biological Chemistry – 1998. – N.16. – P.9357– 9360.

106. Kachar B. Evidence for the lipidic nature of tight junction strands / B.
Kachar, T. S. Reese // Nature. – 1982. – V.296. – N. 5856. – P. 464-466.

107. Kamada N. Regulation of the immune system by the resident intestinal bacteria / N. Kamada, G. Núñez // Gastroenterology. – 2014. – V.146. – N. 6. – P. 1477-1488.

108. Kamada N. Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease / N. Kamada, S. U. Seo, G. Y. Chen, G. Núñez //Nature Reviews Immunology. – 2013. – V.13. – №. 5. – P. 321-335.

109. Katahira J. Molecular cloning and functional characterization of the receptor for Clostridium perfringens enterotoxin / J. Katahira, N. Inoue, Y. Horiguchi [et al.] //The Journal of cell biology. – 1997. – V. 136. – N. 6. – P. 1239-1247.

110. Keefe D. M. Updated clinical practice guidelines for the prevention and treatment of mucositis / D. M. Keefe, M. M. Schubert, L. S. Elting [et al.] // Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society. – 2007. - V.109. - N. 5. - P. 820-831.

111. Kennedy M. Successful and sustained treatment of chronic radiation proctitis with antioxidant vitamins E and C / M. Kennedy, K. Bruninga, E. A. Mutlu [et al.] // The American journal of gastroenterology. -2001. - V.96. - N. 4. - P. 1080-1084.

112. Khan S. Protective effect of sesamol against 60Co γ -ray-induced hematopoietic and gastrointestinal injury in C57BL/6 male mice / S. Khan, A. Kumar, J. S. Adhikari [et al.] //Free radical research. – 2015. – V.49. – N. 11. – P. 1344-1361.

113. Kiang J. G. Hemorrhage enhances cytokine, complement component 3, and caspase-3, and regulates microRNAs associated with intestinal damage after whole-body gamma-irradiation in combined injury / J. G. Kiang, J. T. Smith, M. N. Anderson [et al.] // PLoS One. -2017. - V.12. - N. 9. - P. e0184393.

114. Kiuchi-Saishin Y. Differential expression patterns of claudins, tight junction membrane proteins, in mouse nephron segments / Y. Kiuchi-Saishin, S. Gotoh, M. Furuse [et al.] //Journal of the American Society of Nephrology. – 2002.
– V. 13. – N. 4. – P. 875-886

115. Kotova O. Cardiotonic steroids stimulate glycogen synthesis in human skeletal muscle cells via a Src-and ERK1/2-dependent mechanism / O. Kotova, L. Al-Khalili, S. Talia [et al.] //Journal of Biological Chemistry. – 2006a. – V.281. – N. 29. – P. 20085-20094.

116. Kotova O. Metabolic and signaling events mediated by cardiotonic steroid ouabain in rat skeletal muscle / O. Kotova, D. Galuska, B. Essen-Gustavsson,
A. V. Chibalin // Cellular and molecular biology. – 2006b. – V.52. – N. 8. – P. 48-57.

117. Kozieł M. J. Intestinal barrier, claudins and mycotoxins / M. J. Kozieł,
M. Ziaja, A. W. Piastowska-Ciesielska // Toxins. – 2021. – V.13. – N. 11. – P. 758.

118. 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. – V.21. – N 8. – P. 2875.

119. Krivoĭ I. I. Regulatory function of the Na,K-ATPase alpha2 isoform /
I. I. Krivoĭ // Biofizika. – 2012. – V.57. – N. 5. – P. 771-788.

120. 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 [et al.] // Molecular biology of the cell. – 2009. – V.20. – N. 16. – P. 3713-3724.

121. Lai F. Identification of a mutant α 1 Na/K-ATPase that pumps but is defective in signal transduction / F. Lai, N. Madan, Q. Ye [et al.] // Journal of Biological Chemistry. – 2013. – V.288. – N. 19. – P. 13295-13304.

122. Lameris A. L. Expression profiling of claudins in the human gastrointestinal tract in health and during inflammatory bowel disease / A. L. Lameris, S. Huybers, K. Kaukinen [et al.] // Scandinavian journal of gastroenterology. – 2013. – V.48. – N. 1. – P. 58-69.

123. 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. – N 25. – P. 11387-11392.

124. 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. – Academic Press, 2014. – V.36. – P. 149-156.

125. Lawrence T. S. Ouabain sensitizes tumor cells but not normal cells to radiation / T. S. Lawrence // International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics. – 1988. – V.15. – N. 4. – P. 953-958.

126. Le Moellic C. Aldosterone and tight junctions: modulation of claudin4 phosphorylation in renal collecting duct cells / C. Le Moellic, S. Boulkroun, D.
González-Nunez [et al.] // American Journal of Physiology-Cell Physiology. – 2005.
– T. 289. – №. 6. – P. C1513-C1521.

127. Lee K. Interaction of the alpha subunit of Na,K-ATPase with cofilin /
K. Lee, J. Jung, M. Kim, G. Guidotti / K. Lee // The Biochemical Journal. – 2001. –
V.353. – N. Pt 2. – P. 377-385.

128. Lee W. R. Late toxicity and biochemical recurrence after externalbeam radiotherapy combined with permanent-source prostate brachytherapy: analysis of Radiation Therapy Oncology Group study 0019 / W. R Lee, K. Bae, C. Lawton [et al.] // Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society. – 2007. – V.109. – N. 8. – P. 1506-1512.

129. Lee Y. J. Inflammation, impaired motility, and permeability in a guinea pig model of postoperative ileus / Y. J. Lee, Z. Hussain, C. W. Huh [et al.] // Journal of neurogastroenterology and motility. -2018. - V.24. - N. 1. - P. 147.

130. Levin S. G. Estimation of median human lethal radiation dose computed from data on occupants of reinforced concrete structures in Nagasaki, Japan / S. G. Levin, R. W. Young, R. L. Stohler // Health physics. – 1992. – V.63. – N. 5. – P. 522-531.

131. Li Z. NaKtide, a Na/K-ATPase-derived peptide Src inhibitor, antagonizes ouabain-activated signal transduction in cultured cells / Z. Li, T. Cai, J. Tian [et al.] // Journal of Biological Chemistry. – 2009. – V.284. – N. 31. – P. 21066-21076.

132. Li Z. Transcriptional regulators of Na,K-ATPase subunits / Z. Li, S.
A. Langhans // Frontiers in cell and developmental biology. – 2015. – V.3. – P. 66.

133. Lim T. S. Kinetics of adhesion mediated by extracellular loops of claudin-2 as revealed by single-molecule force spectroscopy / T.S. Lim, S. R. K. Vedula, W. Hunziker, C. T. Lim // Journal of molecular biology. – 2008. – V. 381. – N. 3. – P. 681-691.

134. Lioni M. Dysregulation of claudin-7 leads to loss of E-cadherin expression and the increased invasion of esophageal squamous cell carcinoma cells / M. Lioni, P. Brafford, C. Andl [et al.] // The American journal of pathology. – 2007. – V.170. – N. 2. – P. 709-721.

135. Liu J. Ouabain interaction with cardiac Na+/K+-ATPase initiates signal cascades independent of changes in intracellular Na+ and Ca2+ concentrations
/ J. Liu, J. Tian, M. Haas [et al.] // Journal of Biological Chemistry. – 2000. – V.275.
– N. 36. – P. 27838-27844.

136. Liu L. Comparative properties of caveolar and noncaveolar preparations of kidney Na+/K+-ATPase / L. Liu, A. V. Ivanov, M. E. Gable [et al.] // Biochemistry. – 2011. – V.50. – N. 40. – P. 8664-8673.

137. Liu L. β -Subunit of cardiac Na+-K+-ATPase dictates the concentration of the functional enzyme in caveolae / L. Liu, A. Askari // American Journal of Physiology-Cell Physiology. – 2006. – V.291. – N. 4. – P. C569-C578.

138. Liu Q. Role of the mucin-like glycoprotein FCGBP in mucosal immunity and cancer / Q. Liu, X. Niu, Y. Li [et al.] // Frontiers in Immunology. – 2022. – P. 3856.

139. Loh Y. H. Extensive expansion of the claudin gene family in the teleost fish, Fugu rubripes / Y. H. Loh, A. Christoffels, S. Brenner [et al.] // Genome Research. – 2004. – V.14. – N. 7. – P. 1248-1257.

140. Lu Z. Claudins in intestines: Distribution and functional significance in health and diseases / Z. Lu, L. Ding, Q. Lu [et al.] // Tissue barriers. – 2013. – V.1. – N. 3. – P. e24978.

141. Luettig J. Claudin-2 as a mediator of leaky gut barrier during intestinal inflammation / J. Luettig, R. Rosenthal, C. Barmeyer, J. D. Schulzke // Tissue barriers. – 2015. – V. 3. – N. 1-2. – P. e977176.

Macià I Garau M. M. Radiobiology of the acute radiation syndrome /
M. M. Macià I Garau, A. L. Calduch, E. C. López // Reports of Practical Oncology and Radiotherapy. – 2011. – V.16. – N. 4. – P. 123-130.

Marchiando A. M. Epithelial barriers in homeostasis and disease / A.
M. Marchiando, W. V. Graham, J. R. Turner //Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease. – 2010. – V. 5. – P. 119-144.

144. 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 [et al.] //Pflügers Archiv-European Journal of Physiology. – 2019. – V.471. – P. 1183-1189.

145. Markov A. G. Claudin clusters as determinants of epithelial barrier function / A. G. Markov, J. R. Aschenbach, S. Amasheh // IUBMB life. – 2015. – V.
67. – N. 1. – P. 29-35.

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 [et al.] // Pflügers Archiv-European Journal of Physiology. – 2014. – V.466. – P. 2059-2065.

147. Markov A. G. et al. Circulating ouabain modulates expression of claudins in rat intestine and cerebral blood vessels / A. G. Markov, A. A. Fedorova, V. V. Kravtsova [et al.] // International Journal of Molecular Sciences. – 2020. – V.21. – N. 14. – P. 5067.

148. Markov A. G. Segmental expression of claudin proteins correlates with tight junction barrier properties in rat intestine / A. G. Markov, A.Veshnyakova,

M. Fromm [et al.] // Journal of Comparative Physiology B. – 2010. – V.180. – P. 591-598.

149. Markov A. G. The epithelial barrier and beyond: Claudins as amplifiers of physiological organ functions / Markov A. G., Aschenbach J. R., Amasheh S. //IUBMB life. – 2017. – V.69. – N. 5. – P. 290-296.

150. Markov A.G. Claudin expression in follicle-associated epithelium of rat Peyer's patches defines a major restriction of the paracellular pathway / A.G. Markov, E.L. Falchuk, N.M. Kruglova [et al.] // Acta Physiologica. – 2016. – V.216. – N 1. – P. 112-119.

151. Marshman E. Caspase activation during spontaneous and radiationinduced apoptosis in the murine intestine / E. Marshman, P. D. Ottewell, C. S. Potten, A. J. Watson // The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland. – 2001. – V.195. – N. 3. – P. 285-292.

152. Matchkov V. V. Specialized functional diversity and interactions of the Na,K-ATPase / V. V. Matchkov, I. I. Krivoi //Frontiers in physiology. – 2016. – V.7. – P. 179.

153. 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 [et al.] // Nature. – 2012. – V. 483. – N. 7389. – P. 345-349.

154. Mercantepe F. The effects of N-acetylcysteine on radiotherapyinduced small intestinal damage in rats / F. Mercantepe, A. Topcu, S. Rakici [et al.] // Experimental Biology and Medicine. – 2019. – V.244. – N. 5. – P. 372-379.

155. Meric F. Prevention of radiation enteritis in children, using a pelvic mesh sling / F. Meric, R. B. Hirschl, S. Mahboubi [et al.] // Journal of pediatric surgery. – 1994. – V.29. – N. 7. – P. 917-921.

156. Merritt A. J. Differential expression of bcl-2 in intestinal epithelia. Correlation with attenuation of apoptosis in colonic crypts and the incidence of colonic neoplasia / A. J. Merritt, C. S. Potten, A. J. Watson [et al.] // Journal of cell science. – 1995. – V.108. – N. 6. – P. 2261-2271.

157. Michael M., Yap A. S. The regulation and functional impact of actin assembly at cadherin cell–cell adhesions / M. Michael, A. S. Yap // Seminars in cell & developmental biology. – Academic Press, 2013. – V.24. – N. 4. – P. 298-307. 158. Mihandoost E. Consequences of lethal-whole-body gamma radiation and possible ameliorative role of melatonin / E. Mihandoost, A. Shirazi, S. R. Mahdavi, A. Aliasgharzadeh // The Scientific World Journal. – 2014. – V. 2014.

159. Milatz S. Claudin-3 acts as a sealing component of the tight junction for ions of either charge and uncharged solutes / S. Milatz, S. M. Krug, R. Rosenthal [et al.] //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes. – 2010. – V. 1798. – N. 11. – P. 2048-2057.

160. Mineta K. Predicted expansion of the claudin multigene family / K.
Mineta, Y. Yamamoto, Y. Yamazaki [et al.] // FEBS letters. – 2011. – V.585. – N.
4. – P. 606-612.

161. Mobasheri A. Na+, K+-ATPase isozyme diversity; comparative biochemistry and physiological implications of novel functional interactions / A. Mobasheri, J. Avila, I. Cózar-Castellano [et al.] // Bioscience reports. – 2000. – V.20. – N. 2. – P. 51-91.

162. Mutlu-Türkoğlu Ü. et al. The effect of selenium and/or vitamin E treatments on radiation—induced intestinal injury in rats / Ü. Mutlu-Türkoğlu, Y. Erbil, S. Öztezcan [et al.] // Life Sciences. – 2000. – V.66. – N. 20. – P. 1905-1913.

163. Nakano T. Formation of clustered DNA damage in vivo upon irradiation with ionizing radiation: Visualization and analysis with atomic force microscopy / T. Nakano, K. Akamatsu, M. Tsuda [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2022. – V.119. – N. 13. – P. e2119132119.

164. 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. – V.328. – N. 6130. – P. 533-536.

165. 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 [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. -2000. - V.97. - N.7. -P. 3242-3247.

166. Okugawa T. Down-regulation of claudin-3 is associated with proliferative potential in early gastric cancers / T. Okugawa, T. Oshima, X. Chen [et al.] // Digestive Diseases and Sciences. – 2012. – V.57. – N.6. – P.1562-1567.

167. Osanai M. Epigenetic silencing of occludin promotes tumorigenic and metastatic properties of cancer cells via modulations of unique sets of apoptosis-associated genes / M. Osanai, M. Murata, N. Nishikiori [et al.] //Cancer research. – 2006. – V. 66. – N. 18. – P. 9125-9133.

168. Peters C. A. Low-dose rate prostate brachytherapy is well tolerated in patients with a history of inflammatory bowel disease / C. A. Peters, J. A. Cesaretti, N. N. Stone, R. G. Stock //International Journal of Radiation Oncology – Biology - Physics. – 2006. – V.66. – N. 2. – P. 424-429.

 Pickard J. M. Gut microbiota: Role in pathogen colonization, immune responses, and inflammatory disease / J. M. Pickard, M. Y. Zeng, R. Caruso, G. Núñez //Immunological reviews. – 2017. – V.279. – N. 1. – P. 70-89.

Poindexter S. V. Transcriptional corepressor MTG16 regulates small intestinal crypt proliferation and crypt regeneration after radiation-induced injury / S.
V. Poindexter, V. K. Reddy, M. K. Mittal [et al.] // American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology. – 2015. – V.308. – N. 6. – P. G562-G571.

171. Potten C. S. A comprehensive study of the radiobiological response of the murine (BDF1) small intestine / C. S. Potten // International journal of radiation biology. – 1990. – V.58. – N. 6. – P. 925-973.

172. Potten C. S. Extreme sensitivity of some intestinal crypt cells to X and γ irradiation / C. S. Potten // Nature. – 1977. – V.269. – N. 5628. – P. 518-521.

173. Potten C. S. Stem cells and cellular pedigrees-a conceptual introduction / C. S. Potten, M. Loeffler // Stem Cells. Academic, London. – 1997. – P. 1-27.

174. Potten C. S. Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt / C. S. Potten, M. Loeffler // Development. -1990. - V.110. - N. 4. - P. 1001-1020.

175. Potten C. S. The relationship between ionizing radiation-induced apoptosis and stem cells in the small and large intestine / C. S. Potten, H. K. Grant // British journal of cancer. -1998. - V.78. - N. 8. - P. 993-1003.

176. Powell D. W. Barrier function of epithelia / D. W. Powell // American
Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology. – 1981. – V.241. – N.
4. – P. G275-G288.

177. Prasad S. Inflammatory processes have differential effects on claudins
2, 3 and 4 in colonic epithelial cells / S. Prasad, R. Mingrino, K. Kaukinen [et al.] //
Laboratory investigation. – 2005. – V. 85. – N. 9. – P. 1139-1162.

178. Rahner C. Heterogeneity in expression and subcellular localization of claudins 2, 3, 4, and 5 in the rat liver, pancreas, and gut / C. Rahner, L. L. Mitic, J. M. Anderson // Gastroenterology. – 2001. – V.120. – N. 2. – P. 411-422.

179. Rajamanickam G. D. Na/K-ATPase regulates bovine sperm capacitation through raft-and non-raft-mediated signaling mechanisms / Rajamanickam G. D., Kastelic J. P., Thundathil J. C. //Molecular Reproduction and Development. – 2017a. – V.84. – N. 11. – P. 1168-1182.

180. 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. – 2017b. – V.96. – N. 2. – P. 456-468.

181. Rajasekaran A. K. Na,K-ATPase and epithelial tight junctions / A. K.
Rajasekaran, S. A. Rajasekaran // Frontiers in Bioscience-Landmark. – 2009. – V.14.
– N. 6. – P. 2130-2148.

182. 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. – N
3. – P. 757-769.

183. 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 [et al.] // American Journal of Physiology-Cell Physiology. – 2003. – V.284. – N. 6. – P. C1497-C1507.

184. 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 [et al.] // American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology. – 2007. – V.292. – N. 1. – P. G124-G133.

185. 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 [et al.] //Molecular biology of the cell. – 2010. – V.21. – N. 7. – P. 1200-1213.

186. Riley P. A. Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation / P. A. Riley //International journal of radiation biology. – 1994. – V.65. – N. 1. – P. 27-33.

187. Ringborg U. The Swedish Council on Technology Assessment in Health Care (SBU) systematic overview of radiotherapy for cancer including a prospective survey of radiotherapy practice in Sweden 2001--summary and conclusions / U. Ringborg //Acta oncologica. – 2003. – V.42. – N. 5-6. – P. 357-365.

188. Ritter V. Bcl-2/Bcl-xL inhibitor ABT-263 overcomes hypoxia-driven radioresistence and improves radiotherapy / V. Ritter, F. Krautter, D. Klein [et al.] // Cell Death & Disease. – 2021. – V.12. – N. 7. – P. 694.

189. Robbins M. E. C. Chronic oxidative stress and radiation-induced late normal tissue injury: a review / M. E. Robbins, W. Zhao // International journal of radiation biology. -2004. - V.80. - N. 4. - P. 251-259.

190. Rosenthal R. Claudin-2, a component of the tight junction, forms a paracellular water channel / R. Rosenthal, S. Milatz, S. M. Krug [et al.] // Journal of cell science. – 2010. – V.123. – N. 11. – P. 1913-1921.

191. Russell A. B. A type VI secretion-related pathway in Bacteroidetes mediates interbacterial antagonism / A. B. Russell, A. G. Wexler, B. N. Harding [et al.] // Cell host & microbe. – 2014. – V.16. – N. 2. – P. 227-236.

192. Sabath E. Galpha12 regulates protein interactions within the MDCK cell tight junction and inhibits tight-junction assembly / E. Sabath, H. Negoro, S. Beaudry [et al.] // Journal of Cell Science. – 2008. – V. 121. – N. 6. – P. 814-824.

193. Saitou M. Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands / M. Saitou, M. Furuse, H. Sasaki [et al.] // Molecular biology of the cell. – 2000. – V.11. – N. 12. – P. 4131-4142.

194. Sánchez de Medina F. Intestinal inflammation and mucosal barrier function / F. Sánchez de Medina, I. Romero-Calvo, C. Mascaraque, O. Martínez-Augustin // Inflammatory Bowel Diseases. – 2014. – V.20. – N 12. – P. 2394-2404. 195. Sankaran-Walters S. Guardians of the gut: enteric defensins / S.
Sankaran-Walters, R. Hart, C. Dills //Frontiers in Microbiology. – 2017. – V.8. – P.
647.

196. Schlegel N. Targeting desmosomal adhesion and signalling for intestinal barrier stabilization in inflammatory bowel diseases—Lessons from experimental models and patients / N. Schlegel, K. Boerner, J. Waschke //Acta physiologica. -2021. - V.231. - N. 1. - P. e13492.

197. Schneider M. R. A key role for E-cadherin in intestinal homeostasis and Paneth cell maturation / M. R. Schneider, M. Dahlhoff, D. Horst [et al.] //PloS one. – 2010. – V.5. – N. 12. – P. e14325.

198. Schoner W. Ouabain, a new steroid hormone of adrenal gland and hypothalamus / W. Schoner //Experimental and clinical endocrinology & diabetes. – 2000. – V.108. – N. 07. – P. 449-454.

199. Schuchter L. M. 2002 update of recommendations for the use of chemotherapy and radiotherapy protectants: clinical practice guidelines of the American Society of Clinical Oncology / L. M. Schuchter, M. L. Hensley, N. J. Meropol, E. P. Winer // Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology. – 2002. – V.20. – N. 12. – P. 2895-2903.

200. Segretain D., Falk M. M. Regulation of connexin biosynthesis, assembly, gap junction formation, and removal / D. Segretain, M. M. Falk // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes. – 2004. – V.1662. – N. 1-2. – P. 3-21.

201. Serafino A. WNT-pathway components as predictive markers useful for diagnosis, prevention and therapy in inflammatory bowel disease and sporadic colorectal cancer / A. Serafino, N. Moroni, M. Zonfrillo [et al.] // Oncotarget. – 2014. – V.5. – N. 4. – P. 978.

202. Shadad A. K. Gastrointestinal radiation injury: symptoms, risk factors and mechanisms / A. K. Shadad, F. J. Sullivan, J. D. Martin, L. J. Egan //World journal of gastroenterology: WJG. – 2013. – V.19. – N. 2. – P. 185.

203. Shanahan T. G. Minimization of small bowel volume within treatment fields utilizing customized "belly boards" / T. G. Shanahan, M. P. Mehta, K. L.

Bertelrud [et al.] // International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics. – 1990. – V.19. – N. 2. – P. 469-476.

204. Sher D. J. Cost–effectiveness studies in radiation therapy / D. J. Sher
// Expert review of pharmacoeconomics & outcomes research. – 2010. – V.10. – N.
5. – P. 567-582.

205. Shim S. Claudin-3 expression in radiation-exposed rat models: a potential marker for radiation-induced intestinal barrier failure / S. Shim, J. G. Lee, C. H. Bae [et al.] // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 2015. – V.456. – N. 1. – P. 351-354.

206. Shukla P. K. LPAR2 receptor activation attenuates radiation-induced disruption of apical junctional complexes and mucosal barrier dysfunction in mouse colon / P. K. Shukla, A. S. Meena, R. Gangwar [et al.] // FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology. – 2020. – V.34. – N. 9. – P. 11641.

207. Shukla P. K. Rapid disruption of intestinal epithelial tight junction and barrier dysfunction by ionizing radiation in mouse colon in vivo: protection by N-acetyl-l-cysteine / P. K. Shukla, R. Gangwar, B. Manda [et al.] // American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology. – 2016. – V.310. – N. 9. – P. G705-G715.

208. Sonoda N. Clostridium perfringens enterotoxin fragment removes specific claudins from tight junction strands: Evidence for direct involvement of claudins in tight junction barrier / N. Sonoda, M. Furuse, H. Sasaki [et al.] // The Journal of cell biology. – 1999. – T. 147. – No. 1. – C. 195-204.

209. Srinivas C. Standardization of Mean Lethal Dose (LD 50/30) of Xrays using Linear Accelerator (LINIAC) in Albino Wistar Rat Model Based on Survival Analysis Studies and Hematological Parameters / C. Srinivas, A. Kumar, R. Rai [et al.] // Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. -2015. - V. 6. - N. 5. - P. 1215-1219.

210. Stenson W. F. Prostaglandins and epithelial response to injury / A. K.
Stenson W. F. // Current opinion in gastroenterology. – 2007. – V.23. – N. 2. – P.
107-110.

211. Stiffler M. A. PDZ domain binding selectivity is optimized across the mouse proteome / M. A. Stiffler, J. R. Chen, V. P. Grantcharova [et al.] // Science. – 2007. – V.317. – N. 5836. – P. 364-369.

212. Sugahara S. Proton beam therapy for large hepatocellular carcinoma /
S. Sugahara, Y. Oshiro, H. Nakayama [et al.] // International Journal of Radiation
Oncology - Biology - Physics. – 2010. – V.76. – N. 2. – P. 460-466.

213. Suit H. Proton beams to replace photon beams in radical dose treatments / H. Suit, S. Goldberg, A. Niemierko [et al.] // Acta Oncologica. – 2003. – V.42. – N. 8. – P. 800-808.

214. Suzuki F. Survival of mice with gastrointestinal acute radiation syndrome through control of bacterial translocation / F. Suzuki, B. D. Loucas, I. Ito [et al.] // The Journal of Immunology. -2018. - V. 201. - N. 1. - P. 77-86.

215. Suzuki H. Crystal structure of a claudin provides insight into the architecture of tight junctions / H. Suzuki, T. Nishizawa, K. Tani [et al.] // Science. – 2014. – V.344. – N. 6181. – P. 304-307.

216. Takeichi M. Dynamic contacts: rearranging adherens junctions to drive epithelial remodelling / M. Takeichi // Nature reviews Molecular cell biology. - 2014. - V.15. - N. 6. - P. 397-410.

217. 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 [et al.] // Gastroenterology. – 2011. – V.140. – N. 3. – P. 913-923.

218. Tanaka H. Claudin-21 has a paracellular channel role at tight junctions
/ H. Tanaka, Y. Yamamoto, H. Kashihara [et al.] // Molecular and cellular biology. –
2016. – V.36. – N. 6. – P. 954-964.

219. Tariq H. Cardiac glycosides inhibit TNF- α /NF- κ B signaling by blocking recruitment of TNF receptor-associated death domain to the TNF receptor / Q. Yang, W. Huang, C. Jozwik [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2005. – V.102. – N 27. – P. 9631-9636.

220. Thomson A. The Ussing chamber system for measuring intestinal permeability in health and disease / A. Thomson, K. Smart, M. S. Somerville [и др.] // BMC Gastroenterology. – 2019. – V. 19. – N.1. – Р. 98.

221. Tian J. Binding of Src to Na+/K+-ATPase forms a functional signaling complex / J. Tian, T. Cai, Z. Yuan [et al.] // Molecular biology of the cell. – 2006. – V.17. – N. 1. – P. 317-326.

222. Tokhtaeva E. Subunit isoform selectivity in assembly of Na,K-ATPase α - β heterodimers / E. Tokhtaeva, R. J. Clifford, J. H. Kaplan [et al.] // Journal of Biological Chemistry. – 2012. – V.287. – N. 31. – P. 26115-26125.

223. Torres S. Glucagon-like peptide-2 improves both acute and late experimental radiation enteritis in the rat / S. Torres, L. Thim, F. Milliat [et al.] // International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics. – 2007. – V.69. – N. 5. – P. 1563-1571.

224. Traber P. G. Sucrase-isomaltase gene expression along crypt-villus axis of human small intestine is regulated at level of mRNA abundance / P. G. Traber, L. Yu, G. D. Wu, T. A. Judge //American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology. – 1992. – V.262. – N. 1. – P. G123-G130.

225. Tsukita S. Isolation of cell-to-cell adherens junctions from rat liver /
S. Tsukita, S. Tsukita // The Journal of cell biology. – 1989. – V.108. – N. 1. – P. 3141.

226. Tsukita S., Tanaka H., Tamura A. The claudins: from tight junctions to biological systems / S. Tsukita, H. Tanaka, A. Tamura //Trends in biochemical sciences. – 2019. – V.44. – N. 2. – P. 141-152.

227. Van de Werf E. The cost of radiotherapy in a decade of technology evolution / E. Van de Werf, J. Verstraete, Y. Lievens // Radiotherapy and Oncology. – 2012. – V.102. – N. 1. – P. 148-153.

228. 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. – V. 107. – N. 10. – P. 1319-1327.

229. Van Itallie C. M. Two splice variants of claudin-10 in the kidney create paracellular pores with different ion selectivities / C. M. Van Itallie, S. Rogan,
A. Yu [et al.] // American Journal of Physiology-Renal Physiology. – 2006. – V.291.
– N. 6. – P. F1288-F1299.

230. Vancamelbeke M. The intestinal barrier: a fundamental role in health and disease / M. Vancamelbeke, S. Vermeire // Expert review of gastroenterology & hepatology. – 2017. – V.11. – N. 9. – P. 821-834.

231. 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. – V.22. – On the Many Actions of Ouabain. – N 5. – P. 729.

232. Verheye-Dua F. A. Influence of Apoptosis on the Enhancement of Radiotoxocity by Ouabain / F. A. Verheye-Dua, L. Böhm // Strahlentherapie und Onkologie. – 2000. – V.176. – P. 186-191.

233. Verheye-Dua F. Na+, K+-ATPase inhibitor, ouabain accentuates irradiation damage in human tumour cell lines / F. Verheye-Dua, L. Böhm // Radiation Oncology Investigations: Clinical and Basic Research. – 1998. – V.6. – N. 3. – P. 109-119.

234. Vlad-Fiegen A. The Wnt pathway destabilizes adherens junctions and promotes cell migration via β -catenin and its target gene cyclin D1 / A. Vlad-Fiegen, A. Langerak, S. Eberth, O. Müller //FEBS open bio. – 2012. – V.2. – P. 26-31.

235. Wang A. Gut microbial dysbiosis may predict diarrhea and fatigue in patients undergoing pelvic cancer radiotherapy: a pilot study / A. Wang, Z. Ling, Z. Yang [et al.] // PloS one. – 2015. – V.10. – N. 5. – P. e0126312.

236. Wang C. Ouabain protects mice against lipopolysaccharide-induced acute lung injury / C. Wang, Y. Meng, Y. Wang [et al.] //Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research. – 2018. – V.24. – P. 4455.

237. Wang H. Ouabain assembles signaling cascades through the caveolar Na+/K+-ATPase / H. Wang, M. Haas, M. Liang [et al.] // The Journal of Biological Chemistry. – 2004. – V.279. – N. 17. – P. 17250-17259.

238. Ward J. F. DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability / J. F. Ward //Progress in nucleic acid research and molecular biology. – 1988. – V.35. – P. 95-125.

239. Weigand K. M. Na,K-ATPase activity modulates Src activation: a role for ATP/ADP ratio/ K. M. Weigand, H. G. Swarts, N. U. Fedosova [et al.] // Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes. – 2012. – V.1818. – N. 5. – P. 1269-1273.

Wells J. M. Homeostasis of the gut barrier and potential biomarkers /
J. M. Wells, R. J. Brummer, M. Derrien [et al.] // American Journal of PhysiologyGastrointestinal and Liver Physiology. – 2017. – V.312. – N. 3. – P. G171-G193.

241. Weng X. H. Cultured monolayers of the dog jejunum with the structural and functional properties resembling the normal epithelium / X. H. Weng, K. W. Beyenbach, A. Quaroni // American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology. – 2005. – V.288. – N. 4. – P. G705-G717.

242. World Health Organization. Manual on radiation haematology / World Health Organization. – Vienna: International Atomic Energy Agency, 1971. – 450 p.

243. Wu X. Maternal dietary uridine supplementation reduces diarrhea incidence in piglets by regulating the intestinal mucosal barrier and cytokine profiles / X. Wu, L. M. Gao, Y. L. Liu [et al.] // Journal of the Science of Food and Agriculture. – 2020. – V.100. – N. 9. – P. 3709-3718.

244. Xie Z. Na+-K+–ATPase-mediated signal transduction: from protein interaction to cellular function / Z. Xie, T. Cai // Molecular interventions. – 2003. – V.3. – N. 3. – P. 157.

245. Ye Q. Expression of mutant α1 Na/K-ATPase defective in conformational transition attenuates Src-mediated signal transduction / Q. Ye, F. Lai, M. Banerjee [et al.] //Journal of biological chemistry. – 2013. – V.288. – N. 8. – P. 5803-5814.

246. Yong Y. ERK1/2 mitogen-activated protein kinase mediates downregulation of intestinal tight junction proteins in heat stress-induced IBD model in pig / Y. Yong, J. Li, D. Gong [et al.] // Journal of Thermal Biology. – 2021. – V.101. – P. 103103.

247. Yu A. S. L. Knockdown of occludin expression leads to diverse phenotypic alterations in epithelial cells / A. S. Yu, K. M. McCarthy, S. A. Francis

[et al.] // American Journal of Physiology-Cell Physiology. $-2005. - T. 288. - N_{\odot}. 6.$ - C. C1231-C1241.

Yu A. S. L. Molecular basis for cation selectivity in claudin-2–based paracellular pores: identification of an electrostatic interaction site / A. S. L. Yu, M. H. Cheng, S. Angelow [et al.] // The Journal of general physiology. – 2009. – V.133. – N. 1. – P. 111-127.

249. Yuan Z. Na/K-ATPase tethers phospholipase C and IP3 receptor into a calcium-regulatory complex / Z. Yuan, T. Cai, J. Tian [et al.] // Molecular biology of the cell. – 2005. – V.16. – N. 9. – P. 4034-4045.

250. 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 [et al.] // Gut. – 2007. – V.56. – N. 1. – P. 61-72.

251. Zhang K. Radiation decreases murine small intestinal HCO3– secretion / K. Zhang, L. Yin, M. Zhang, M. D. Parker [et al.] //International journal of radiation biology. – 2011. – V.87. – N. 8. – P. 878-888.

252. Zong Q. F. Effects of porcine epidemic diarrhea virus infection on tight junction protein gene expression and morphology of the intestinal mucosa in pigs / Q. F. Zong, Y. J. Huang, L. S. Wu [et al.] // Polish journal of veterinary sciences. -2019. - V.22. - N. 2. - P. 345-353.