

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЙ И КЛЕТОЧНОЙ БИОЛОГИИ СО РАН
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «НОВОСИБИРСКИЙ
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ»

На правах рукописи

МЕДВЕДЕВА СНЕЖАННА СЕРГЕЕВНА

**ОСОБЕННОСТИ НАРУШЕНИЯ ЭПИТЕЛИАЛЬНОГО
БАРЬЕРА ТОЛСТОГО КИШЕЧНИКА НА МЫШИНЫХ
МОДЕЛЯХ ХРОНИЧЕСКОГО КОЛИТА**

1.5.22. Клеточная биология

(биологические науки)

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:

кандидат биологических наук,

Кожевникова Елена Николаевна

Новосибирск, 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ	2
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ.....	8
Актуальность темы исследования	8
Цель и задачи исследования.....	10
Научная новизна исследования.....	11
Теоретическая и практическая значимость исследования	12
Положения, выносимые на защиту	13
Апробация работы.....	13
Публикации по теме диссертации	14
Вклад автора	15
Структура и объем работы	16
Благодарности	16
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	17
1.1 Строение защитного барьера кишечника	17
1.1.1 Муциновый слой	17
1.1.2 Эпителий толстой кишки.....	19
1.1.3 Подэпителиальный барьер	28
1.2 Нарушения работы кишечного барьера при воспалении	31
1.3 Модели воспалительных заболеваний кишечника	33
1.3.1 Колит, индуцированный натриевой солью сульфата декстрана.....	34
1.3.2 Трансгенная модель с нокаутом гена <i>Muc2</i>	36
1.4 Метаболизм липидов при воспалительных заболеваниях кишечника.....	37
1.5 Заключение	40
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТОВ	42
2.1 Модели и экспериментальные животные	42
2.1.1 Трансгенная модель с нокаутом гена <i>Muc2</i>	43
2.1.2 DSS-индуцированная модель хронического колита	43
2.2 Введение фосфолипидов в диету мышей.....	43
2.3 Приготовление гистологических срезов толстой кишки.....	44
2.4 Иммуногистохимический анализ.....	44
2.5 Выделение крипт толстой кишки	46
2.6 Культивирование крипт толстой кишки	46
2.7 Культивирование эксплантов толстой кишки	47
2.8 Культивирование органоидов, полученных из крипт толстой кишки	47
2.9 Вестерн-блоттинг	48

2.10 Ректальное введение веществ мышам.....	49
2.11 Просвечивающая электронная микроскопия.....	49
2.12 Измерение скорости потребления кислорода.....	50
2.13 Функциональный тест на проницаемость кишечника <i>in vivo</i>	51
2.14 Функциональный тест на проницаемость органоидов	51
2.15 Метаболомный анализ крипт толстой кишки методом жидкостной хроматографии и тандемной масс-спектрометрии.....	52
2.16 Выделение тотальной РНК и обратная транскрипция.....	53
2.17 Количественная ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени.....	54
2.18 Статистическая обработка данных	55
ГЛАВА 3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	56
3.1 Изучение локализации белков клаудина-7, E-кадгерина и β -катенина в клетках эпителия толстой кишки у мышей <i>Muc2^{-/-}</i>	56
3.2 Характеристика локализации белка клаудина-7 в органоидах, полученных из крипт толстой кишки мышей <i>Muc2^{-/-}</i>	58
3.3 Изучение структурной целостности крипт толстой кишки при кратковременном культивировании <i>ex vivo</i>	59
3.4 Оценка морфологии клеток эпителия в эксплантах толстой кишки в процессе культивирования <i>ex vivo</i>	60
3.5 Влияние дестабилизации F-актина на структуру и функцию плотных и адгезивных контактов у мышей дикого типа	63
3.6 Анализ организации F-актина и межклеточных контактов в эпителии толстой кишки на модели хронического колита, индуцированного DSS	65
3.7 Исследование метаболических нарушений и изменение экспрессии генов, участвующих в регуляции липидного метаболизма и перестройке F-актина у мышей <i>Muc2^{-/-}</i>	66
3.8 Изучение эффекта длительного воздействия экзогенных фосфолипидов на ультраструктуру эпителия толстой кишки.....	68
3.9 Оценка влияния краткосрочного воздействия экзогенных фосфолипидов на ультраструктуру, митохондриальное дыхание и проницаемость кишечного барьера <i>in vivo</i>	70
3.10 Изучение влияния экзогенного церамида C6 на актиновый цитоскелет и межклеточные контакты в эпителии толстой кишки.....	73
3.11 Влияние ингибирования церамидсинтаз на структуру F-актина и межклеточных контактов в толстой кишке мышей <i>Muc2^{-/-}</i>	75
3.12 Влияние ингибирования церамидсинтаз на структуру F-актина и межклеточных контактов в толстой кишке мышей с DSS-индуцированным колитом.....	76
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	78
4.1 Особенности морфологии эпителиального барьера при хроническом воспалении на <i>ex vivo</i> и <i>in vitro</i> моделях.....	78
4.1.1 Органоиды толстой кишки	78
4.1.2 Экспланты и выделенные крипты толстой кишки	79
4.2 Изменение экспрессии и локализации белков плотных и адгезивных контактов при воспалительных заболеваниях кишечника и в моделях воспаления.....	81

4.3 Нарушение динамики F-актина при хроническом воспалении и его влияние на межклеточные контакты.....	83
4.4 Влияние липидного метаболизма на барьерную функцию кишечного эпителия.....	85
4.4.1 Эффекты фосфолипидов на структуру и функцию митохондрий.....	86
4.4.2 Роль церамидов в регуляции проницаемости клеточного барьера.....	88
4.4.3 Структурные и функциональные свойства церамид-содержащих липидных рафтов.....	92
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	95
ВЫВОДЫ.....	96
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	97

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АБМ – антибиотик-антимикотик

АК – адгезивные контакты

АТФ/АДФ/АМФ – аденозинтрифосфат / аденозиндифосфат /аденозинмонофосфат

БСА – бычий сывороточный альбумин

ВЗК – воспалительные заболевания кишечника

гДНК – геномная ДНК

ГТФаза – гуанозинтрифосфат-гидролаза

ДАГ – диацилглицерол

ДТТ – дитиотреитол

дФЛ – длительная диета, богатая фосфолипидами

кДНК – комплементарная ДНК

мРНК – матричная РНК

ПК – плотные контакты

ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия

СМаза – сфингомиелиназа

СРК – синдром раздражённого кишечника

Тх – Т-хэлперные лимфоциты

ФБС – фетальная бычья сыворотка

ФК – фазово-контрастная микроскопия

ФИ/ФС/ФХ – фосфатидилинозитол / фосфатидилсерин / фосфатидилхолин

ЦТФ/ЦДФ – цитидинтрифосфат / цитидиндифосфат

ЭДТА – этилендиаминтетраацетат

ЭПР – эндоплазматический ретикулум

DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) – 4,6-диамидино-2-фенилиндол

DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium F12) – Модифицированная среда Игла Дульбекко с добавлением питательных веществ F-12

DNBS (dinitrobenzenesulfonic acid) – динитробензолсульфокислота

dNTP (deoxynucleoside triphosphate) – дезоксинуклеозидтрифосфат

DPBS (Dulbecco's phosphate-buffered saline) – Фосфатно-солевой буфер Дульбекко

DSS (dextran sodium sulfate) – натриевая соль сульфата декстрана

ECL (extracellular loop) – внеклеточная петля

EGF (epidermal growth factor) – эпидермальный фактор роста

FB1 (fumonisin B1) – фумонизин B1

FCCP (carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone) – Карбонилцианид-р-трифторметоксифенилгидразон

FITC (fluorescein isothiocyanate) – флуоресцеин изотиоцианат

F-актин (filamentous actin) – филаментный актин

GWAS (genome-wide association study) – полногеномный поиск ассоциаций

HMDB (Human Metabolome Database) – база данных метаболомов человека

HRP (horseradish peroxidase) – пероксидаза хрена

IFN- γ (interferon gamma) – интерферон гамма

Ig (immunoglobulin) – иммуноглобулин

IL (interleukin) – интерлейкин

JAM (junctional adhesion molecule) – соединительная молекула адгезии

JP (jasplakinolide) – джасплакинолид

KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) – Киотская энциклопедия генов и геномов

LatA (latrunculin A) – латрункулин А

LEF/TCF (lymphoid enhancer factor / T-cell factor) – фактор энхансера лимфоидных клеток / фактор Т-клеток

MAPK (mitogen-activated protein kinase) – митоген-активируемая протеинкиназа

MDCK (Madin-Darby canine kidney) – клетки почек собаки Мадина-Дарби

mTOR (mammalian target of rapamycin) – мишень рапамицина у млекопитающих

NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) – ядерный фактор «каппа-би»

NLR-рецептор (nucleotide-binding-and-oligomerization-domain-like receptor) – NOD-подобный рецептор

OCR (oxygen consumption rate) – скорость потребления кислорода

PBS (phosphate-buffered saline) – фосфатно-солевой буфер

PCA (principal component analysis) – анализ главных компонент

PI3K (phosphoinositide 3-kinase) – фосфоинозитид-3-киназа

RACE (rapid antigen uptake into the cytosol of enterocytes) – быстрый захват антигенов в цитоплазму энтероцитов

ROCK (Rho-associated protein kinase) – Rho-киназа

SDS (sodium dodecyl sulfate) – додецилсульфат натрия

STAT (signal transducer and activator of transcription) – сигнальный белок и активатор транскрипции

TFF (trefoil factors) – фактор трилистника

TGF- β (transforming growth factor-beta) – трансформирующий фактор роста бета

TLR (Toll-like receptor) – Toll-подобный рецептор

TNBS (2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid) – 2,4,6-тринитробензолсульфокислота

TNF- α (tumor necrosis factor alpha) – фактор некроза опухоли альфа

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Эпителий кишечника представляет собой высокоспециализированный селективный барьер, обеспечивающий транспорт питательных веществ и одновременно ограничивающий проникновение патогенных факторов из внешней среды. Барьерная функция эпителия реализуется за счёт системы межклеточных контактов, регулирующих прохождение метаболитов, макромолекул и ионов между эндотелиоцитами. Нарушение функции межклеточных контактов вызывает повышенную проницаемость эпителия, которая сопутствует ряду заболеваний человека и известна в литературе как «дырявый кишечник» (leaky gut). Такое состояние способствует транслокации антигенов из просвета кишечника во внутреннюю среду организма, индуцируя иммунный ответ и поддержание хронического воспаления [1].

Повышенная проницаемость кишечного барьера является одним из патофизиологических признаков воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК), таких как язвенный колит и болезнь Крона. Эти заболевания относятся к многофакторным хроническим патологиям желудочно-кишечного тракта, этиология которых в настоящее время не до конца установлена. Язвенный колит характеризуется изолированным воспалением слизистой оболочки толстой кишки [2], тогда как болезнь Крона носит очаговый трансмуральный характер и может поражать любые отделы желудочно-кишечного тракта [2, 3]. Дифференциальная диагностика ВЗК представляет собой сложную задачу клинической практики, что осложняет объективную оценку распространённости этих патологий. По имеющимся эпидемиологическим данным, заболеваемость ВЗК в странах с высоким уровнем индустриализации демонстрирует устойчивый рост [4]. Несмотря на множественные исследования, причины развития ВЗК остаются предметом научной дискуссии. С ВЗК ассоциированы такие факторы риска, как диета с высоким содержанием жирных и жареных продуктов, красного мяса и сахаров, курение, злоупотребление алкоголем, приём нестероидных противовоспалительных препаратов и оральных контрацептивов, а также воздействие загрязнённого воздуха [5, 6]. Геномные ассоциативные исследования (GWAS, genome-wide association study) выявили более 200 локусов, связанных с риском возникновения ВЗК, среди которых преобладают гены, участвующие в регуляции иммунного ответа. Усиление воспалительных реакций способствует развитию патологического ответа на нормальную и патогенную микробиоту, а также продукты её метаболизма, что сопровождается нарушением целостности эпителиального барьера [3, 5, 7].

Дефекты барьерной функции кишечника были показаны и при других патологических состояниях. К таким относится синдром раздраженного кишечника (СРК), который характеризуется нарушением вегето-висцеральной регуляции работы желудочно-кишечного тракта, как правило, не сопровождающееся выраженными поражениями слизистой оболочки кишечника. Однако клинические данные пациентов с СРК демонстрируют нарушение межклеточных контактов в эпителии кишечника [8].

Повышение проницаемости кишечника наблюдается и при ожирении – хроническом заболевании, сопровождающемся избыточным развитием жировой ткани. И воспаление, ассоциированное с ожирением, и диета с повышенным содержанием липидов могут приводить к нарушению межклеточных контактов кишечного эпителия, хотя точные механизмы нарушения эпителиального барьера при ожирении остаются неясными [8, 9]. Литературные данные указывают на то, что диета с высоким содержанием жиров способствует изменению состава микробиоты и ассоциированных с ней метаболитов, приводя к формированию вялотекущего («низкого», «low-grade») воспаления. Сходный механизм повышения проницаемости кишечного барьера описан и для пациентов с сахарным диабетом 1 и 2 типа [8, 10].

Изменения кишечного барьера выявляются при хронической сердечной недостаточности. У пациентов с этим диагнозом повышение проницаемости кишечной стенки коррелирует с выраженностью патологического процесса, что, вероятно, обусловлено нарушением кровоснабжения кишечника, развитием ишемии и ацидоза слизистого слоя [8, 11]. Таким образом, широкий спектр заболеваний, ассоциированных с нарушением барьерной функции кишечника, подчёркивает необходимость дальнейшего изучения механизмов регуляции проницаемости кишечного эпителия. Особый интерес представляет поиск молекулярных мишеней, отвечающих за модуляцию проницаемости эпителия, а также разработка персонализированных подходов к оценке и коррекции целостности кишечного барьера.

Подавляющее большинство литературных данных, посвященных регуляции барьерной функции кишечника, получена в культивируемых клетках, которые не отражают сложные взаимодействия эпителия с другими системами организма, или на моделях острого воспаления. В то же время, описанные патологии человека носят хронический характер и сопровождаются «низким» воспалением (для ВЗК соответствует стадии ремиссии) и постоянным нарушением барьерной функции. Механизмы формирования повышенной проницаемости кишечника при хроническом низкоуровневом воспалении

остаются недостаточно изученными. В связи с этим особую ценность представляет использование моделей животных с хроническим воспалением.

Одной из таких моделей являются мыши с нокаутом гена *Muc2*, который кодирует основной секретируемый гликопротеин кишечника муцин-2. В результате мутации гена *Muc2* у животных отсутствует муциновый слой, который в норме защищает эпителий от контакта с кишечной микробиотой. Литературные данные свидетельствуют о патологически высокой проницаемости эпителия кишечника и нарушении локализации белка плотных контактов клаудина-3 в этой модели. В эпителиальных клетках толстого кишечника у животных *Muc2*^{-/-} нарушена структура филаментного актина (F-актина), который служит основой для формирования комплексов межклеточных контактов. Было показано, что уровень экспрессии генов, кодирующих белки межклеточных контактов, у муцин-дефицитных мышей не отличаются от такового у животных дикого типа [12]. В свете этих данных особый интерес представляет изучение субклеточной архитектуры кишечного эпителия при вялотекущем воспалении, с фокусом на роли цитоскелета, в частности, микрофиламентов актина, в поддержании целостности межклеточных контактов. Подобный подход позволит выявить фундаментальные механизмы, лежащие в основе нарушения барьерной функции кишечника, при хроническом воспалении.

Цель и задачи исследования

Цель данной работы: выявление клеточных и метаболических особенностей нарушения эпителиального барьера на мышинных моделях хронического колита: обусловленного мутацией гена *Muc2* и химической индукцией натриевой солью сульфата декстрана.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Оценить представленность и локализацию F-актина и белков плотных и адгезивных контактов в двух моделях хронического воспаления кишечника на мышах;
2. Установить влияние модуляторов полимеризации F-актина на локализацию белков клаудина-7 и β -катенина и функцию межклеточных контактов;
3. Описать метаболомный профиль крипт толстой кишки на фоне хронического воспаления у мышей с нокаутом гена *Muc2*;
4. Провести ультраструктурный и функциональный анализ митохондрий, плотных и адгезивных контактов в толстой кишке после воздействия экзогенных фосфолипидов;

5. Оценить эффект воздействия керамидов и ингибитора керамидсинтаз на организацию F-актина и локализацию белков клаудина-7 и β -катенина в двух моделях хронического воспаления кишечника на мышах.

Научная новизна исследования

Настоящее исследование расширяет понимание молекулярных и клеточных механизмов нарушения барьерной функции кишечного эпителия при хроническом воспалении. Было показано, что у мышей с генетически обусловленным дефицитом белка муцина-2 наблюдается нарушение локализации белков межклеточных контактов – клаудина-7, E-кадгерина и β -катенина – на латеральных мембранах энтероцитов толстой кишки при сохранении общего уровня этих белков в сравнении с животными дикого типа. Была установлена зависимость организации и функции межклеточных контактов от стабильности филаментов актина. Показано, что нарушение баланса между полимерной и мономерной формами актина сопровождается изменением локализации клаудина-7 и β -катенина, что позволяет рассматривать микрофиламенты актина как основополагающую субклеточную структуру, обеспечивающую поддержание межклеточных контактов в эпителии толстой кишки. Таким образом, новизна настоящей работы заключается в том, что изучение свойств эпителиального барьера кишечника включало не только белки межклеточных контактов, но и их взаимодействие с цитоскелетом, выступающим в роли структурного якоря.

Проведённое сопоставление двух *in vivo* моделей хронического воспаления – генетической (*Muc2^{-/-}*) и химически индуцированной (приём раствора натриевой соли сульфата декстрана) – позволило выявить общие цитологические признаки проницаемого кишечного барьера. У животных с нокаутом гена *Muc2* отсутствует муциновый слой, покрывающий эпителий, вследствие чего микробиота толстой кишки контактирует с энтероцитами и вызывает иммунный ответ. Употребление натриевой соли сульфата декстрана животными дикого типа повреждает кишечный барьер по альтернативному механизму, путём гиперосмотического повреждения энтероцитов и дезорганизации муцинового слоя. Результаты настоящей работы демонстрируют, что у обеих моделей хронического воспаления *in vivo* наблюдается нарушение организации F-актина и локализации белков межклеточных контактов. Сравнение цитологических особенностей эпителиального барьера моделей с воспалением разной этиологии расширяет понимание универсальных клеточных механизмов, лежащих в основе нарушения целостности кишечного барьера.

Дана оценка экспериментальных систем *in vitro* и *ex vivo* с точки зрения их применимости для изучения характеристик кишечного барьера в условиях хронического воспаления. Установлено, что в процессе формирования культивируемых трёхмерных органоидов толстой кишки *in vitro*, полученных от животных *Muc2^{-/-}* наблюдается восстановление ожидаемой локализации клаудина-7, утраченной в исходной ткани. В то же время, модели *ex vivo* характеризуются ограниченной стабильностью субклеточной организации: структурная целостность и жизнеспособность крипт сохраняется не более 1 часа, тогда как нормальная морфология эксплантов толстой кишки поддерживается до 18 часов. Полученные данные определяют границы применения указанных моделей для изучения механизмов поддержания архитектоники кишечного барьера, а также для оценки эффективности потенциальных терапевтических воздействий *in vitro* и *ex vivo*.

В рамках настоящего исследования проведён анализ метаболитов в эпителии толстой кишки животных с генетически обусловленным дефицитом белка муцина-2, в результате которого выявлено обогащение метаболических путей, связанных с регуляцией фосфо- и сфинголипидного обмена. Дополнительное исследование транскрипционной активности генов, ответственных за модуляцию сборки актинового цитоскелета и липидного метаболизма, подтвердило наличие нарушений, тем самым подкрепляя полученные ранее морфологические и функциональные данные.

Приведенное исследование показывает, что диета с повышенным содержанием фосфолипидов оказывает выраженное негативное воздействие на функцию и ультраструктуру митохондрий в энтероцитах толстой кишки животных дикого типа. Описано накопление липидных капель внутри крист митохондрий как возможного варианта нормы, ранее не зафиксированного в литературе, что требует дальнейшего изучения на уровне морфологии и функции митохондрий.

Наконец, впервые установлено, что ингибирование синтеза церамидов с помощью фумонизина B1 приводит к восстановлению структуры F-актина и локализации β -катенина в двух моделях хронического воспаления кишечника на мышах, что указывает на потенциальную терапевтическую значимость путей обмена сфинголипидов в регуляции барьерной функции кишечного эпителия.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Полученные в данной работе результаты имеют как фундаментальное, так и прикладное значение в области патологий кишечного барьера. Выделяется ключевая роль структурной дезорганизации F-актина в условиях хронического воспалительного процесса,

что позволяет выявить универсальные нарушения архитектуры цитоскелета, характерные как для генетической, так и для химически-индуцированной моделей колита. Таким образом, исследование расширяет современные представления о ключевой роли F-актина в поддержании целостности и функциональной состоятельности эпителиального барьера.

Сравнительное описание моделей *ex vivo* и *in vitro* (эксплантов и трёхмерных органоидов), проведённое в контексте изучения барьерной функции эпителия, формирует методологическую основу для их дальнейшего применения в фундаментальных и прикладных исследованиях. Установленные ограничения времени жизнеспособности культивируемых клеточных систем позволяют более тщательно определять экспериментальные подходы и клеточные системы в зависимости от задач исследования.

Данное исследование демонстрирует связь между нарушениями липидного обмена и изменениями организации цитоскелета, митохондрий и межклеточных контактов в клетках эпителия толстой кишки. Это позволяет рассматривать пути биосинтеза церамидов и фосфолипидов в качестве потенциальных мишеней для терапии повышенной проницаемости кишечника как ключевого аспекта в патогенезе различных заболеваний. В практическом приложении полученные результаты могут быть использованы для совершенствования экспериментальных моделей и разработки новых терапевтических стратегий, направленных на восстановление кишечного барьера при хронических воспалительных состояниях.

Положения, выносимые на защиту

На защиту выносятся следующие положения:

1. Снижение уровня филаментного актина (F-актина) в эпителии толстой кишки мышей, приводит к нарушению функции межклеточных контактов – изменениям в локализации белков клаудина-7 и β -катенина на латеральных мембранах энтероцитов и повышению проницаемости эпителиального барьера.
2. Накопление церамидов в энтероцитах толстой кишки мышей с хроническим воспалением кишечника, обусловленным дефицитом белка муцина-2, вызывает снижение уровня F-актина в клетках и последующие нарушения функции эпителиального барьера.
3. Воздействие ингибитора церамидсинтаз фумонизина B1 на эпителий толстой кишки мышей с химически индуцированным хроническим колитом приводит к повышению

содержания F-актина и восстановлению нормальной локализации белка адгезивных контактов β -катенина на латеральных мембранах клеток.

Апробация работы

Результаты работы были представлены на следующих научных конференциях:

1. **Saydakova S.S.**, Ogienko A.A., Boldyreva L.V., Kozhevnikova E.N. Distribution of cell junction proteins in the descending colon of *Muc2* mice. // Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology (BGRS/SB-2022). Новосибирск, 2022. – С. 721.
2. Болдырева Л.В., Огиенко А.А., Ачасова К.М., **Сайдакова С.С.**, Кожевникова Е.Н. Прижизненный имиджинг эксплантов эпителия как перспектива для персонализированной диагностики воспалительных заболеваний кишечника. // Коллекции культур клеток человека и животных: современные вызовы и сетевые решения. Санкт-Петербург, 2022 г. – С. 32-33.
3. Болдырева Л.В., Огиенко А.А., Ачасова К.М., **Сайдакова С.С.**, Кожевникова Е.Н. Возможности прижизненного имиджинга эксплантов эпителия кишечника для персонализированной диагностики и подбора терапии при ВЗК. // Синтетическая биология и биофармацевтика, Новосибирск, 2022 г. – С. 157.
4. Кожевникова Е.Н., Болдырева Л.В., **Сайдакова С.С.**, Ачасова К.М., Огиенко А.А. Механизмы регуляции динамики цитоскелета при развитии воспаления и формировании защитного барьера кишки на мышинных моделях хронического колита. // XXIV съезд физиологического общества им. И.П. Павлова. Санкт-Петербург, 2023 г. – С. 108-109.
5. **Медведева С.С.**, Ачасова К.М., Болдырева Л.В., Огиенко А.А., Кожевникова Е.Н. Роль церамидов в развитии синдрома повышенной проницаемости кишечника. // 27-я Пущинская школа-конференция молодых ученых с международным участием “Биология - наука XXI века”. Пущино, 2024 г. – С. 298.
6. **Medvedeva S.S.**, Boldyreva L.V., Achasova K.M., Ogienko A.A., Kozhevnikova E.N. Dysfunction of intercellular junctions in chronic colitis models. // Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology (BGRS/SB-2024), Новосибирск, 2024 г. – С. 1278-1279.
7. **Medvedeva S.S.**, Boldyreva L.V., Achasova K.M., Ogienko A.A., Kozhevnikova E.N. Ceramide affects intestinal epithelial barrier integrity via destabilization of actin cytoskeleton in chronic colitis. // Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology (BGRS/SB-2024), Новосибирск, 2024 г. – С. 1277.

8. **Медведева С.С.**, Попова Ю.В., Ачасова К.М. Кожевникова Е.Н. Механизмы регуляции проницаемости эпителия толстого кишечника на моделях хронического колита. // XX Международная (XXIX Всероссийская) Пироговская научная медицинская конференция. Москва, 2025 г. – С. 191-192.

Публикации по теме диссертации

По материалам диссертации опубликованы следующие статьи в рецензируемых журналах:

1. Boldyreva L.V., Morozova M.V., **Saydakova S.S.**, Kozhevnikova E.N. Fat of the Gut: Epithelial Phospholipids in Inflammatory Bowel Diseases // Int J Mol Sci. – 2021. – Vol. 22(21) – p. 11682. (Импакт-фактор SJP: 5,026, индексируется РИНЦ, Scopus, Web of Science) doi: 10.3390/ijms222111682
2. **Saydakova S.S.**, Morozova K.N., Snytnikova O.A., Morozova M.V., Boldyreva L.V., Kiseleva E.V., Tsentalovich Y.P., Kozhevnikova E.N. The effect of dietary phospholipids on the ultrastructure and function of the intestinal epithelial cells. // Int J Mol Sci. – 2023. – Vol. 24(2) – p. 1788. (Импакт-фактор SJP: 5,026, индексируется РИНЦ, Scopus, Web of Science) doi.org: 10.3390/ijms24021788
3. **Medvedeva S.S.**, Achasova K.M., Boldyreva L.V., Ogienko A.A., Kozhevnikova E.N. The application of explants, crypts, and organoids as models in intestinal barrier research. // Tissue Barriers. – 2024. – опубликовано онлайн. (Импакт-фактор SJP: 5,146, индексируется РИНЦ, Scopus, Web of Science) doi: 10.1080/21688370.2024.2423137

Вклад автора

Автором самостоятельно выполнялись следующие этапы настоящей работы: цитологические методы (приготовление цитологических препаратов с их последующим непрямым иммуноокрашиванием и визуализацией на конфокальном микроскопе, электронно-микроскопический анализ), культуральные работы (выделение тканей, крипт из тканей животных, культивирование эксплантов и органоидов, оценка проницаемости *in vitro*), работа с животными (получение химически индуцированной модели хронического колита, ректальное введение веществ, оценка проницаемости *in vivo*).

Оценка экспрессии целевых белков методом вестерн-блот анализа была проведена совместно с Кожевниковой Е. Н. Нетаргетный метаболомный анализ ткани толстой кишки методом масс-спектрометрии проводился в центре коллективного пользования передовой масс-спектрометрии Сколтех (Сколковский институт науки и технологий, Москва). Анализ

данных метаболомного профилирования проводился Кожевниковой Е. Н. Проведение экспериментов по краткосрочному и длительному кормлению животных фосфолипидами осуществлялось автором совместно с Морозовой М. В. и Болдыревой Л. В. Часть экспериментов по получению и культивированию органоидов проводилась автором совместно с Ачасовой К. М. Оценка потребления кислорода криптами кишки с помощью системы SeaHorse Agilent HF (Agilent Technologies, США) осуществлялась автором совместно с Ачасовой К. М., Болдыревой Л. В. и Кожевниковой Е. Н. на оборудовании вивария ИЦиГ СО РАН. Подготовка препаратов для электронной микроскопии осуществлялась совместно с Морозовой К. Н. на базе сектора структурной биологии клетки ИЦиГ СО РАН. Получение снимков на электронном микроскопе проводилось в центре коллективного пользования микроскопического анализа ИЦиГ СО РАН.

Структура и объем работы

Диссертация состоит из оглавления, списка сокращений, введения, обзора научной литературы, описания использованных материалов и методов, результатов, обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы, содержащего 294 источника. Работа изложена на 116 страницах, содержит 18 рисунков, 2 таблицы.

Благодарности

Автор выражает благодарность всем принимавшим участие в получении, обсуждении и публикации результатов настоящей работы. Особую признательность автор выражает коллегам из лаборатории моделирования патологий человека ИМКБ СО РАН за непосредственную организацию исследования, помощь и поддержку на всех этапах подготовки диссертации. Автор благодарит сотрудников лаборатории клеточного деления ИМКБ СО РАН за предоставление реактивов, оборудования и совместное написание публикаций; сектора структурной биологии клетки ИЦиГ СО РАН за пробоподготовку для электронно-микроскопического анализа и предоставленные снимки. Часть работы была выполнена на оборудовании ЦКП микроскопического анализа биологических объектов ИЦиГ СО РАН, и автор выражает благодарность его сотрудникам за техническую помощь. Автор благодарит ЦКП передовой масс-спектрометрии Сколковского института науки и технологий за осуществление метаболомного профилирования предоставленных материалов.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Строение защитного барьера кишечника

Слизистая оболочка кишечника представляет собой барьер между внешними факторами и внутренней средой организма. Её ключевая функция – ферментирование, абсорбция питательных веществ и всасывание воды. Одновременно с этим, слизистая оболочка препятствует проникновению микроорганизмов и антигенов в кровоток, выполняя барьерную и защитную функцию. [13]. Кишечный барьер состоит из трёх структурных слоёв. Внешний, непосредственно контактирующий с внешней средой компонент барьера – это муциновый слой, состоящий из сети гликопротеинов и являющийся субстратом для микробиоты. Средний слой представлен поляризованным эпителием, который состоит из абсорбционных энтероцитов и специализированных клеток, связанных межклеточными контактами. Последний, самый глубокий, субэпителиальный слой представлен собственной пластинкой (*lamina propria*), которая включает иммунные клетки: Т- и В-лимфоциты, макрофаги, тучные и дендритные клетки [1, 14].

1.1.1 Муциновый слой

Поверхность слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта покрыта слизистым секретом, который выполняет функцию физико-химического барьера. Регулярная продукция секрета механически препятствует контакту и адгезии компонентов микробиоты на поверхности энтероцитов. Симбиотические микроорганизмы, населяющие слизистый слой, синтезируют витамины и антимикробные пептиды [8]. Присутствующие в секрете пищеварительные ферменты, иммуноглобулин А, факторы трилистника (TFF, trefoil factor family), рибонуклеазы, дефензины и фосфолипазы разрушают патогены, поступающие с пищей, и стабилизируют слизистый слой [8]. Перистальтика кишечника способствует постоянному перемещению слизистого секрета и его компонентов.

Слизистый секрет состоит из воды (в норме >98%), белков, липидов и активных молекул и имеет гелеобразную консистенцию благодаря гликопротеинам муцинам. Муцины – семейство белков, аминокислотная цепь которых содержит последовательности tandemных повторов, богатые гидроксипролином, треонином и серином, которые подвергаются посттрансляционному О-гликозилированию [15]. Такая структура обосновывает гигроскопичность муцинов и их устойчивость к протеолизу. Разные представители семейства муцинов отличаются длиной и количеством tandemных повторов

[15]. На основании механизма образования и функций муцины делят на два типа: связанные с мембранами (муцин-1, -3, -4, -17) и секретируемые (муцин-2, -5, -6, -7) [13]. Секретируемые в просвет кишечника муцины подразделяют на гелеобразующие и растворимые (Рисунок 1). В структуре гелеобразующих секретируемых муцинов присутствуют богатые цистеином домены, которые позволяют белкам связываться друг с другом и формировать гидратированную гелевую сеть, что отличает их от растворимых секретируемых муцинов [16]. Белок муцин-2 (Mucin 2) – ключевой компонент слизистого слоя, потеря которого приводит к развитию воспаления в толстой кишке [12, 17].

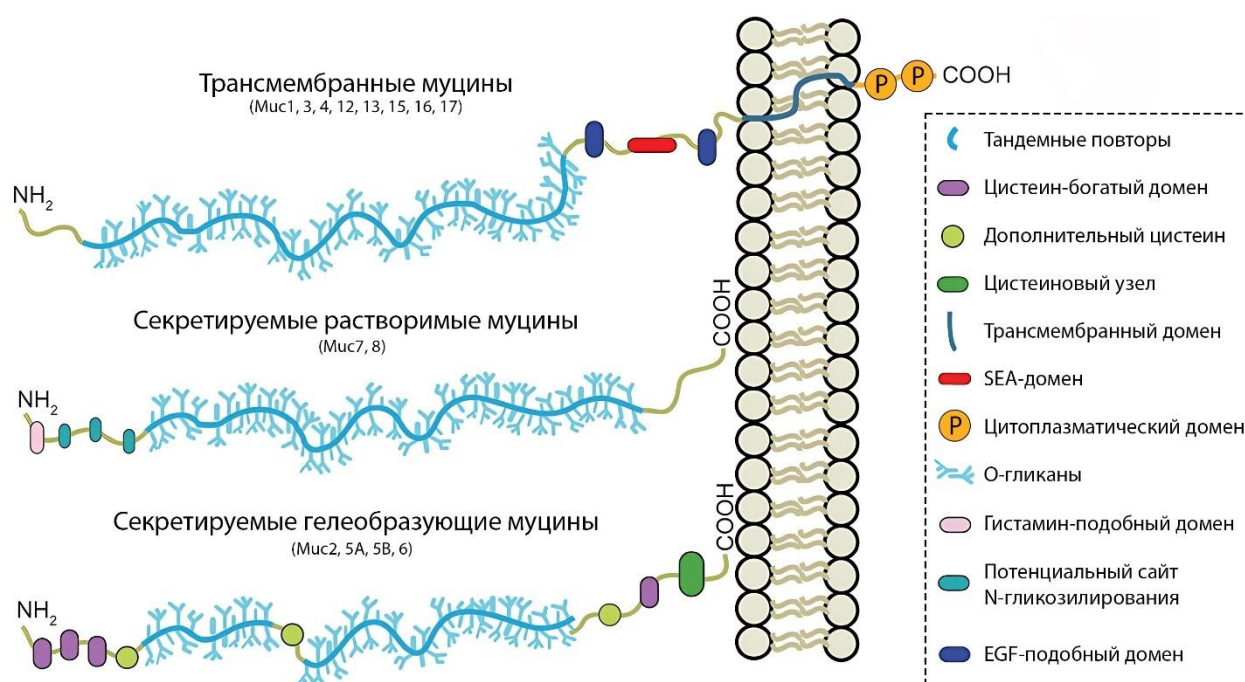


Рисунок 1. Структура муцинов. SEA - Sperm protein, Enterokinase and Agrin, EGF – эпителиальный фактор роста. С изменениями, по [18]

Слизистый слой в толстой кишке разделяется на внутренний и наружный слой, которые формируют градиент плотности муцинового геля и колонизации микробиотой от эпителия к просвету [19]. Внутренний слой состоит из более плотной сети муцинов и не заселён микроорганизмами; нарушение его стерильности приводит к бактериальной инвазии в более глубокие слои кишечного барьера [20]. Внешний слой слизистого секрета представлен рыхлой сетью муцинов и населен бактериями, такими как *Bacteroides acidifaciens*, *Bacteroides fragilis* и *Akkermansia muciniphila*. Эти микроорганизмы способствуют сохранению функции барьера посредством конкуренции с патогенами и регулирования метаболических путей [21]. Например, *A. muciniphila* регулирует секрецию антимикробного пептида RegIII γ , который проявляет бактерицидную активность в отношении грамположительных бактерий [22]. *Bacteroides*

thetaitaomicron усиливает экспрессию небольшого богатого пролином белка 2A, который отвечает за стабилизацию десмосом в эпителии [23]. Известно, что бактерии используют муцины в качестве субстрата и источника углерода и энергии, например, *A. muciniphila*, *B. thetaiotaomicron*, *B. fragilis*, *Bifidobacterium bifidum*, и *Ruminococcus gnavus* выделяют гликозидазы, сульфатазы и сиалидазы, которые расщепляют сеть О-гликанов муцинов с образованием моносахаридов [24]. Обратное взаимодействие наблюдается в том, что продукты метаболизма бактерий, такие как липополисахариды и пептидогликаны, стимулируют секрецию муцина [1, 24]. Таким образом, состав слизистого слоя влияет на микробиоту кишечника, а микробиота определяет свойства слизистого геля.

1.1.2 Эпителий толстой кишки

Эпителий толстой кишки представлен монослоем поляризованных призматических клеток, основную популяцию которых составляют абсорбционные энтероциты, а также бокаловидные, энтероэндокринные, пучковые и М-клетки [25–27]. Энтероциты специализируются на пристеночном пищеварении и всасывании питательных веществ; их апикальная поверхность образует «щёточную каёмку» из микроворсинок, покрытых гликокаликсом. К энтероэндокринным клеткам относятся: L-клетки, вырабатывающие пептид YY и глюкаго-подобный пептид 1; D-клетки, секретирующие соматостатин и вазоактивный интестинальный пептид; энтерохромаффинные клетки, отвечающие за синтез и депонирование серотонина [25]. Пучковые клетки, функционирующие как хемосенсоры, реагируют на внешние стимулы выделением цитокина IL-25, простагландинов E₂ и D₂, цистеиниллейкотриена C₄ и ацетилхолина, обеспечивая антигельминтный и антипротозойный иммунитет [28, 29]. М-клетки отвечают за захват из просвета кишечника антигенов и их перенос в подслизистые слои для иммунного мониторинга и контроля воспаления [30]. Поверхность толстой кишки организована в структурные единицы – крипты, в базальной части которых располагается пул мультипотентных стволовых клеток, обеспечивающих постоянную регенерацию и замещение отмирающих эпителиоцитов [31]. На дне крипт локализуются клетки Панета, которые вырабатывают α-дефензины, лизоцим и фосфолипазу A2 для борьбы с бактериями, но их наличие более характерно для тонкой кишки, чем для толстой [26, 32, 33].

Эпителиальные клетки несут образ-распознающие TLR и NLR-рецепторы [34, 35]. Они активируются при контакте с патогенами, увеличении секреции пептидов, противомикробных препаратов, цитокинов и хемокинов [36]. Было показано, что

эндотоксины, связываясь с рецептором TLR4, индуцируют воспалительный иммунный ответ, что приводит к дисфункции кишечного барьера [14]. С другой стороны, активация эпителиального рецептора TLR2, наоборот, снижает воспаление и проницаемость эпителия [37].

Для поддержания барьерной функции эпителиальные клетки соединены в единый пласт апикальными соединительными комплексами, в которые входят плотные контакты, адгезивные контакты и десмосомы (Рисунок 2) [1, 13]. Межклеточные соединения регулируют параклеточный поток ионов, воды и малых молекул, исключая проникновение непереваренных фрагментов пищи и микроорганизмов в собственную пластинку [13]. Плотные и адгезивные контакты выполняют свою функцию благодаря микрофиламентам, образующим подмембранный цитоскелет, с которым связываются комплексы межклеточных контактов. Призматические клетки эпителия закреплены на базальной мембране с помощью фокальных контактов, которые также взаимодействуют с филаментным актином (F-актином), обеспечивая апикально-базальную поляризацию и передачу механического напряжения между клетками и внеклеточным матриксом. На апикальной поверхности F-актин служит в качестве основы для формирования микроворсинок [38].

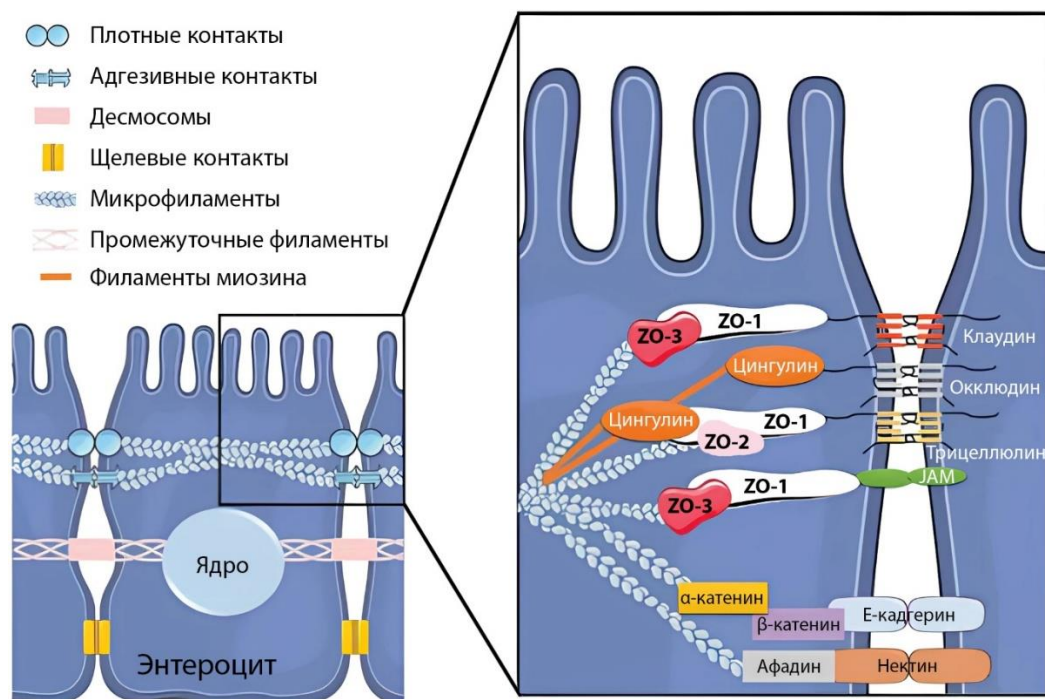


Рисунок 2. Апикальные соединительные комплексы энтероцитов. ZO (zonula occludens) – белок плотных контактов, JAM (junctional adhesive molecule) – соединительная молекула адгезии. По [39], с модификациями.

В рамках данной работы исследование было сфокусировано на плотных и адгезивных контактах, их структура будет подробно описана в следующих подразделах.

Плотные контакты

Плотные контакты (ПК) – апикально локализованные белковые комплексы, физически сближающие мембраны соседних клеток на расстояние 10 нм [40]. Они состоят из трансмембранных белков – окклюдина (Occludin), клаудинов (Claudin, Cldn) и соединительных молекул адгезии (junctional adhesion molecule, JAM), которые связываются с микрофиламентами посредством цитоплазматических белков плотных контактов ZO (zonula occludens) и цингулина (cingulin) [8, 14]. В местах контакта трёх клеток в области ПК белок окклюдин замещён родственным белком трицеллюлином (tricellulin) [41, 42]. Для поддержания структурной целостности ПК необходимо присутствие в среде ионов кальция. В литературных источниках высказывается предположение, что недостаток или избыток Ca^{2+} нарушает связь цитоплазматических белков ZO с F-актином и локализацию окклюдина [43]. В пределах одной мембраны трансмембранные белки объединяются в олигомеры, которые, в свою очередь, выстраиваются в тяжи, опоясывающие и скрепляющие латеральные мембраны соседствующих клеток. Связь цитоплазматических белков с трансмембранными имеет динамичный характер и отвечает за регуляцию проницаемости [38, 44].

Ключевыми компонентами ПК являются трансмембранные белки клаудины. Члены семейства клаудинов демонстрируют тканеспецифичный паттерн экспрессии, обеспечивая уникальные для каждой ткани барьерные свойства. Млекопитающие имеют около 24-27 гомологичных клаудинов, которые присутствуют в большом разнообразии эпителиев: респираторном, желудочно-кишечном, железистом, эндотелии сосудов [45, 46]. В рамках данного обзора клаудины будут рассмотрены только с точки зрения кишечной проницаемости.

Белки ПК могут адаптироваться к различным потребностям клеток, запирая или открывая межклеточное пространство в различных физиологических и патологических условиях. Выделяют три группы клаудинов в зависимости от их функции: замыкающие, порообразующие и смешанные. Замыкающие (sealing) белки клаудины отвечают за сужение межклеточной щели и понижение проницаемости эпителия. Порообразующие (pore-forming), напротив, способствуют повышению проницаемости, формируя поры, которые позволяют ионам и незаряженным молекулам пересекать эпителиальный барьер в зависимости от заряда и размера. Так, к замыкающим относятся белки клаудин-1, -3, -4, -5,

-6, -8, -9, -11, -14, -18, -19, которые снижают проницаемость эпителия для катионов или анионов. Белки клаудин-2, -10В, -15А и -16 образуют поры для одновалентных катионов, а белки клаудин-10А и 17 могут облегчать параклеточный транспорт анионов [45]. Кроме того, белок клаудин-2 способствует проницаемости эпителия для молекул воды [45]. Клаудин-7 относят к смешанному типу, поскольку есть свидетельства в пользу его вклада как в порообразующую, так и в замыкающую функцию [45, 46]. Для белков клаудин-12, 13 и 20–24 функция пока не определена. Существование белков клаудин-21 и -24 выявили исключительно из анализа генома человека и их специфичность пока не изучена [46].

Клаудины не локализуются строго в области ПК, а распределены на протяжении всей латеральной мембраны. Такая локализация способствует формированию неклассических адгезивных клеточных контактов, взаимодействию с другими рецепторами клеточной поверхности (например, с другими молекулами клеточной адгезии, тетраспанинами, интегринами, Т-клеточными рецепторами), и внутриклеточной передаче сигналов через цитоплазматические белки [45]. Имеются также данные о ядерной локализации клаудинов, предполагающие их участие в регуляции экспрессии генов, возможно, в контексте развития рака [45]. Однако их роль в ядре, если таковая имеется, до сих пор неизвестна.

Молекулярный вес клаудинов составляет 21-34 кДа [45]. Каноническая структура клаудина включает короткий внутриклеточный N-конец, после которого следуют четыре трансмембранных домена, разделённые двумя внеклеточными петлями (extracellular loops – ECL) и одной внутриклеточной петлёй, и длинный внутриклеточный C-конец (Рисунок 3). C-конец содержит PDZ-связывающий мотив, благодаря которому клаудины взаимодействуют с PDZ-доменами адаптерных белков, позволяющих ПК закрепиться на микрофиламентах [45, 46]. К таким адаптерным белкам относятся цитоплазматические белки ZO-1, 2 и 3. Внеклеточная петля ECL1 состоит примерно из 50 аминокислот с двумя консервативными цистеинами, участвующими в замыкающей функции. Отрицательно и положительно заряженные аминокислоты в ECL1 способствуют образованию пор, их замена на остатки с другим зарядом может привести к смене специфичности пропускаемых ионов [46]. ECL2 имеет размер около 25 аминокислот, и её роль менее изучена. Она может взаимодействовать с обоими ECL клаудинов соседней клетки и уменьшать межклеточное расстояние; замена аминокислот в ECL2 нарушает это взаимодействие [46]. Молекулы одного члена семейства клаудинов могут связываться друг с другом (гомофильное взаимодействие) или с другими членами семейства (гетерофильное взаимодействие), а также в пределах одной или соседних мембран (цис- или транс-взаимодействие соответственно).

Для ECL1 предполагаются два механизма транс-взаимодействий. Порообразующая функция, вероятно, обеспечивается за счет взаимодействия одинаково заряженных аминокислотных остатков ECL1. Замыкающие свойства поддерживаются пространственно-близким расположением положительно и отрицательно заряженных аминокислот, которое препятствует образованию пор. ECL2 вносят вклад в замыкающую функцию посредством гидрофобного транс-взаимодействия между ароматическими аминокислотами двух ECL2 или ECL1 и ECL2 [46]. Цис-взаимодействия обеспечивают олигомеризацию клаудинов и формирование тяжелой ПК, опоясывающих клетку.

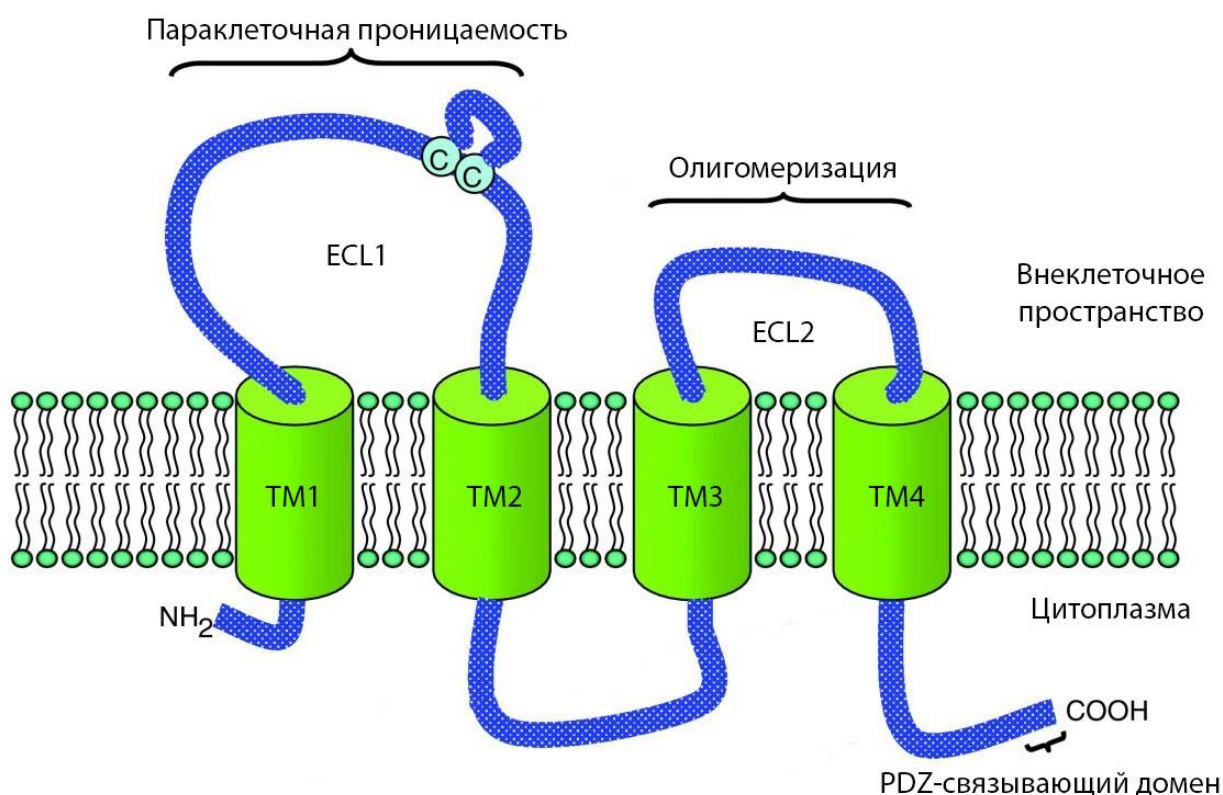


Рисунок 3. Структура клаудинов. ECL – внеклеточная петля; TM – трансмембранный домен, С - цистеины. По [47], с модификациями.

Представленность разных клаудинов на протяжении желудочно-кишечного тракта не является постоянной [48]. Белок клаудин-2 человека, в основном, вырабатывается в желудке и тонкой кишке. Паттерны экспрессии генов *CLDN3*, *CLDN4* и *CLDN7* почти идентичны, их экспрессия преимущественно локализована в толстой и прямой кишке. Ген *CLDN8* демонстрирует градиент экспрессии с тенденцией к увеличению в направлении от проксимальных к дистальным отделам толстой кишки. Гены *CLDN5* и *CLDN12* равномерно экспрессируются во всем желудочно-кишечном тракте, за исключением пищевода [48, 49]. Экспрессия гена *CLDN15* ограничена преимущественно двенадцатиперстной кишкой и подвздошной кишкой, а белок клаудин-18 был обнаружен исключительно в желудке [48].

Схожее распределение экспрессии генов клаудинов наблюдается у крыс и мышей, за исключением генов *Cldn2* и *Cldn18*, которые, в отличие от человека, у этих животных не экспрессируются в тканях желудка, но присутствуют в толстой кишке [45]. Некоторые клаудины демонстрируют дифференциальную экспрессию вдоль оси крипты [45, 50].

Белок клаудин-7 представляет интерес, поскольку исследования его функции *in vitro* дают противоречивые выводы, и его часто относят к клаудинам со смешанной функцией. Разные работы демонстрируют, что при сверхэкспрессии белка клаудина-7 в клетках LLC-PK (эпителиальные клетки почки поросёнка) происходит снижение проницаемости для Cl^- и одновременное незначительное увеличение проницаемости для Na^+ , но точно такой же эффект имеет место и при нокдауне гена *CLDN7* в культурах клеток MDCK (Madin-Darby canine kidney, клетки почек собаки Мадина-Дарби) и LLC-PK [45, 51, 52]. Это характеризует белок клаудин-7 как порообразующий, селективность которого определяется условиями в клетке. С другой стороны, у пациентов с ВЗК и в химически индуцируемой натриевой солью сульфата декстрана (DSS) модели наблюдается снижение экспрессии гена *CLDN7*, при этом делеция данного гена повышает проницаемость кишечного эпителия, что может говорить о его вкладе в запирающую функцию [51, 53]. Ещё одной характерной особенностью белка клаудина-7 является его равномерная локализация во всём эпителии кишечника [45, 51, 54]. В настоящее время доступны модели мышей с нокаутом различных генов клаудинов, но ВЗК-подобные симптомы наблюдаются именно у животных *Cldn7*^{-/-} [55]. Примечательно, что межклеточная адгезионная молекула EpcAM напрямую связывается с белком клаудин-7 вне комплексов ПК, а нарушение регуляции этого комплекса может способствовать развитию колоректального рака [56]. Учитывая свойства клаудина-7, описанные в литературе, данный белок представляет интерес не только в составе ПК, но и как компонент других белковых комплексов [55].

ПК поддерживают полярность эпителиальных клеток, препятствуя обмену молекул (липидов и белков) между апикальной и базолатеральной доменами плазмалеммы. Благодаря этому физическому разделению апикальная мембрана обогащена холестерином, сфинголипидами, фосфатидилинозитол(3,4)-бисфосфатом, фосфатидилинозитол(4,5)-бисфосфатом, в то время как основная часть фосфатидилинозитол(3,4,5)-трисфосфата локализована в базолатеральной мембране [57]. Такой химический состав апикальной мембраны способствует созданию гликокаликса из гликолипидов и гликопротеинов, а также формированию более вязких микродоменов мембраны – рафтов или плотов. Липидные плоты образуют компартменты плазматической мембраны, обогащённые белками с трансмембранными доменами. Взаимодействие липидных рафтов разной

плотности может способствовать искривлению мембраны в структурно различные домены, такие как микроворсинки и мембранные домены между ними [57]. Механизмы, благодаря которым ПК препятствуют диффузии между доменами плазмалеммы, до конца не описаны. С одной стороны, нарушение межклеточной связи хелаторами кальция ведёт к переносу липидов и белков между доменами, с другой стороны, снижение уровня синтеза белков ZO-1, -2, -3, нарушающее сборку ПК, не сказывается на поляризации мембраны [57].

Адгезивные контакты

Адгезивные контакты (АК) обеспечивают сцепление между соседними клетками через трансмембранные белки кадгерины, нектины и везатины, которые связываются с F-актином через катенины (α , β , γ), винкулин и афадин [8, 58]. АК расположены на латеральной мембране базальнее ПК и уменьшают межклеточное пространство до 20 нм [40]. В то время, как основная функция ПК – контроль проницаемости эпителиального барьера, АК необходимы для объединения всех клеток эпителия в единую систему, устойчивую к механической деформации благодаря свойствам актин-миозиновых комплексов. Многочисленные регуляторные белки могут воздействовать на основные структурные компоненты АК через рецепторы факторов роста, внутриклеточные киназы и регуляторы динамики актина (например, ГТФазы семейства Rho, миозин, формины и т. д.).

Белки семейства кадгеринов, преимущественно E-кадгерин, образуют параллельные гомодимеры, которые опосредуют Ca^{2+} -зависимую межклеточную адгезию [43, 59]. Внеклеточная часть белка E-кадгерина состоит из пяти повторяющихся доменов, цитоплазматическая часть достаточно консервативна и содержит сайты связывания β -катенина и p120-катенина, способствующих стабилизации E-кадгерина. Белок β -катенин связывает цитоплазматическую часть E-кадгерина с α -катенином, а α -катенин, в свою очередь, связывает белки АК с F-актином [59]. Белок винкулин родственен α -катенину, и может связывать α -катенин и F-актин, способствуя позиционированию АК. Имеются свидетельства в пользу того, что белок ZO-1, характерный для ПК, может выполнять сходную функцию в составе АК [59]. Комплекс белков афадин-нектин построен аналогично с комплексом белков кадгерин-катенин: афадин соединяет гомодимеры трансмембранного нектина с F-актином, образуя комплекс Ca^{2+} -независимой межклеточной адгезии [40]. Белки везатины связываются с микрофиламентами через миозин-VIIA [58].

Из составных частей АК особенно интересен белок β -катенин, который выступает не только в качестве связующего звена между E-кадгерином и микрофиламентами, но также способен проникать в ядро и функционировать в качестве транскрипционного кофактора

генов сигнального пути Wnt. Передача сигналов Wnt/ β -катенин опосредует множество событий в эмбриогенезе и в ходе дифференцировке клеток, тогда как aberrантная активация этого пути играет роль в онкогенезе. Находясь в ядре, белок β -катенин взаимодействует с факторами транскрипции LEF/TCF (lymphocyte enhancer factor / T-cell factor) и активирует транскрипцию генов-мишеней Wnt, например, теломеразы и морфогенов [60, 61]. В контексте передачи сигналов Wnt/ β -катенин дефицит белка β -катенина приводит к дифференцировке стволовых клеток и снижает способность эпителия к обновлению. Таким образом, активация сигнального каскада Wnt необходима для поддержания мультипотентных свойств и недифференцированного состояния кишечных стволовых клеток [62]. Любопытно отметить, что ген *CLDN1* является одним из генов, регулируемых β -катенином [63]. Изменение уровня белка β -катенина и сопутствующая передача внутриклеточного сигнала вовлечена процесс опухолообразования, поэтому данный белок считается протоонкогеном, а связывающий и, следовательно, регулирующий его E-кадгерин выступает в качестве белка-супрессора опухолей [64]. Избыток белков E-кадгерина или α -катенина может ингибировать рост посредством противодействия передаче сигналов β -катенина [58, 59]. Наконец, уровень цитоплазматического белка β -катенина контролируется фосфорилированием его N-конца, что даёт сигнал к убиквитин-зависимой деградации [65].

Функциональная связь актинового цитоскелета с белками плотных и адгезивных контактов

В поляризованных эпителиальных клетках актомиозиновый цитоскелет демонстрирует чёткую специфичность пространственной организации в апикальном и базолатеральном компартментах. Белковые комплексы межклеточных контактов ассоциированы с кольцевым поясом сократительного F-актина, который играет важную роль в регуляции параклеточной проницаемости и адгезии.

Сигнальные каскады, активированные воспалением, могут запускать перестройку апикального актинового цитоскелета, приводящую к разборке межклеточных контактов за счет сигнальных каскадов Rho. Белки семейства ГТФаз Rho – это небольшие сигнальные G-белки, которые регулируют многие аспекты внутриклеточной динамики актина посредством Rho-ассоциированной протеинкиназы (Rho-associated protein kinase, ROCK) [66, 67]. Активация Rho влияет на актиновый цитоскелет с помощью различных механизмов, которые включают стимуляцию активности немышечного миозина II посредством ROCK, а также изменения динамики актиновых филаментов [68]. Последний эффект достигается подавлением ADF/кофилин-зависимой деполимеризации и

Rho/формин-зависимым контролем полимеризации микрофиламентов [68]. ROCK косвенно стабилизирует F-актин за счет ингибирования кофилина, белка, который деполимеризует F-актин. С другой стороны, ROCK подавляет активность фосфатазы легких цепей миозина, что приводит к стимуляции актин-зависимой АТФазной активности миозина и актин-миозиновому сокращению [66].

Сама ГТФаза Rho регулируется факторами обмена гуаниновых нуклеотидов и белками, активирующими ГТФазы, которые активируют и деактивируют сигналинг Rho, соответственно [68, 69]. Инактивация Rho ГТФазы приводит к избирательному нарушению целостности ПК и повреждению эпителиального барьера. Было показано, что RhoA активируется во время разборки АК/ПК в условиях дефицита внеклеточного кальция, а ингибирования Rho или ROCK достаточно, чтобы предотвратить разборку контактов [70]. С другой стороны, есть данные, что делеция RhoA в эпителии или фермента, который способствует истощению пула этой ГТФазы, вызывает повреждение эпителиального барьера [71]. Таким образом, целостность ПК зависит от тонкого баланса активности Rho: как дефицит, так и избыток активного Rho оказывают значительный эффект на структуру актина и целостность кишечного эпителия [68]. И, в свою очередь, ПК также регулируют активность Rho ГТФаз, таких как RhoA и Cdc42, тем самым влияя на организацию актомиозиновой сети и сокращение в месте соприкосновения клеток [72].

Недавние исследования АК показывают, что механическое напряжение и динамика актина в межклеточных контактах, опосредованных E-кадгеринами, могут способствовать кластеризации E-кадгерина, что приводит к образованию более крупных и стабильных соединительных комплексов [72]. Ключевым эффектом такой механосенсорной регуляции является стабильность взаимодействия белков АК с кортикальной сетью актомиозина [72]. Зависимые от механического напряжения изменения в составе и конформационной организации АК и ПК могут влиять на силу межклеточных контактов, однако механизм передачи механического сигнала остается неизученным [72]. В эмбрионах рыбок *Danio rerio* накопление белка ZO-1 в ПК тесно связано с напряжением сетей актомиозина соседних клеток, демонстрируя, что эти межклеточные контакты способны осуществлять механосенсорную функцию [72].

Взаимодействие E-кадгерина с микрофиламентами опосредовано белком α -катенином, который может влиять на свойства актина путем прямого связывания с ним или привлекая белки формин, ZO-1, и α -актинин [59]. Мономеры и особенно димеры белка α -катенина конкурируют с сайтами связывания комплекса Agr2/3, подавляя разветвление и

полимеризацию актина и связывая микрофиламенты в пучки [73]. Актин-ассоциированный белок α -актинин сшивает длинные филаменты между собой в области АК, образуя более надёжную и стабильную основу для прикрепления белков межклеточных контактов [59]. Белок катенин p120 не связывает актин напрямую, но регулирует динамику актина благодаря своей способности ингибировать ГТФазу Rho [59]. Исследования показали, что основные структурные компоненты комплексов нектин/афадин и кадгерин/катенин могут напрямую связываться с регуляторами ГТФаз Rho и локально привлекать ГТФазы Rho к основным компонентам комплексов АК [59].

Несмотря на сходство в строении, есть существенные различия между функцией актина в АК и ПК. Параллельные пучки актиновых филаментов, которые выступают основанием для АК, не характерны для якорных филаментов ПК. Сократимость актомиозинового комплекса, которая принципиально важна для поддержания механической устойчивости ткани к деформации, играет разную роль в этих двух соединениях. Подавление сократительной способности актомиозина разрушает АК, значительно уменьшая количество соединений на основе E-кадгерина и ухудшает механические свойства эпителиального монослоя. С другой стороны, ингибирование сократительной способности актомиозина путем обработки ингибитором ROCK усиливает барьерную функцию ПК [74]. Тепловой стресс повышает проницаемость путём активации протеинкиназы C, которая, в свою очередь, фосфорилирует регуляторную легкую цепь миозина II, приводя к расширению просвета ПК за счет увеличения сократительной способности актина [75].

1.1.3 Подэпителиальный барьер

Собственная пластинка слизистой оболочки кишечника населена сообществом иммунных клеток, которые образуют третью линию защиты кишечного барьера (подэпителиальный барьер). В нормальных условиях поддерживается динамический гомеостаз между кишечной микробиотой и иммунной системой хозяина [13]. Среди клеток собственной пластинки, обеспечивающих врождённый иммунитет, особую роль играют макрофаги и дендритные клетки. Кишечные макрофаги способны захватывать и уничтожать патогены, но благодаря постоянной саморегуляции с помощью цитокина IL-10 и сигналам белка TGF- β от клеток стромы находятся в состоянии резистентности к бактериальным стимулам, что предотвращает избыточное воспаление в слизистой оболочке кишечника. Дендритные

клетки постоянно контактируют с антигенами из просвета кишечника через М-клетки или межэпителиальные дендритные отростки и представляют их Т-лимфоцитам, тем самым связывая врождённый и адаптивный иммунитет [76]. Макрофаги и дендритные клетки несут TLR и NLR рецепторы, которые важны для развития толерантности к комменсальной микробиоте и способствуют заживлению ран. Связывание патоген-ассоциированных молекулярных паттернов с этими рецепторами приводит к продукции провоспалительных цитокинов, хемокинов и антимикробных пептидов [76–78].

Тучные клетки – ещё один важный компонент врождённого иммунитета слизистой оболочки кишечника. Они производят везикулы, наполненные гистамином, протеазами, гепарином и экспрессируют рецепторы к IgE, через которые способны мгновенно реагировать на антигены. В норме тучные клетки регулируют проницаемость эпителия и тонус сосудов. При стимуляции патогенами тучные клетки высвобождают фактор некроза опухоли TNF- α и хемокины, привлекая лейкоциты к месту проникновения инфекции [79].

Лимфоидные клетки врождённого иммунитета представляют собой популяцию лимфоцитов, лишённых специфических антигенных рецепторов. Они выполняют функции «врождённых аналогов» Т-хелперов, выделяя цитокины уже на ранних этапах иммунного ответа [80]. К ним относятся естественные клетки-киллеры, обладающие цитотоксической активностью: они распознают стрессированные или инфицированные клетки и уничтожают их, высвобождая гранзимы и перфорин, одновременно продуцируя IFN- γ , который усиливает активность макрофагов.

Ключевыми игроками приобретённого иммунного ответа являются Т-клетки. Собственная пластинка кишечника содержит значительное количество лимфоцитов, преимущественно клеток памяти и эффекторных фенотипов. Т-лимфоциты представлены CD8⁺ цитотоксическими клетками и различными субпопуляциями CD4⁺ Т-хелперов (далее Тх). Основными подтипами являются Тх1, Тх2, Тх17 и Т-регуляторные клетки. Тх1 отвечают за секрецию цитокинов IL-2, IL-12, IL-22 TNF- α и IFN- γ и активируются в ответ на внутриклеточные патогены, такие как бактерии, паразиты и вирусы. Клетки Тх2 высвобождают цитокины IL-4, IL-5 и IL-13 и специализируются на устранении гельминтов и внеклеточных микробов. Клетки Тх17 играют решающую роль в защите хозяина от внеклеточных бактериальных и грибковых инфекций в слизистой оболочке и секретируют цитокины IL-17A, IL-17F, IL-21 и IL-22. Есть данные, что болезнь Крона является заболеванием, опосредованным лимфоцитами Тх1/Тх17, в то время как язвенный колит связан с клетками Тх2. Т-регуляторные клетки продуцируют противовоспалительные

цитокины, такие как IL-10 и TGF- β , ограничивая функции эффекторных Т-клеток. Критическая роль Т-регуляторных клеток в поддержании кишечного гомеостаза подтверждена экспериментально: у мышей, неспособных вырабатывать белок IL-10, развивается спонтанный тяжёлый колит [81].

В-лимфоциты собственной пластинки дифференцируются преимущественно в плазматические клетки, вырабатывающие IgG, IgA и IL-10, что позволяет контролировать воспаление [77, 78]. Секреторный IgA покрывает слизистую кишечника и выполняет функции иммунного барьера: он препятствует адгезии бактерий к эпителию, нейтрализует токсины и вирусы, не вызывая при этом выраженного воспаления [82].

Баланс между воспалительными и противовоспалительными сигналами в слизистой оболочке кишечника определяется соотношением Th1 и Th2-клеток, которое задаёт направленность иммунного ответа. Снижение количества или активности Т-регуляторных клеток приводит к гиперактивации иммунного ответа и дальнейшему повреждению эпителия, что является характерным свойством для пациентов с ВЗК [76].

При наличии дефектов кишечного барьера содержимое просвета пересекает эпителий и проникает в собственную пластинку (Рисунок 4). Дендритные клетки и макрофаги активируются при распознавании микробиоты и выделяют цитокины IL-6 и IL-12, индуцирующие дифференцировку наивных Т-клеток. Th1 клетки вырабатывают факторы TNF и IFN- γ , которые посылают эпителиальным клеткам сигнал увеличить проницаемость эпителия, что обеспечивает дальнейший перенос патогенов из просвета кишки в собственную пластинку и усиливает воспаление. IL-13, высвобождаемый клетками Th2, также способствует увеличению потока через катионселективные поры ПК. Т-регуляторные клетки, в противовес, секретируют IL-10 и TGF- β для уменьшения воспаления и снижения проницаемости. Таким образом, баланс про- и противовоспалительных сигналов обеспечивает гомеостаз в собственной пластинке кишки [83]. Клетки Th1, Th17, Th22 секретируют цитокин IL-22, который играет множество ролей в поддержании здоровья кишечника. Белок IL-22 участвует в регенерации эпителиальных клеток, выработке слизистого секрета посредством активации генов муцинов и генов гликозилирования муцинов, дифференциации бокаловидных клеток, а также в высвобождении антимикробных пептидов. Выработка IL-22 приводит к увеличению доли эпителиального порообразующего белка клаудина-2 и, таким образом, может вызывать потерю жидкости, диарею и вымывание патогенов из просвета кишечника. Наконец, IL-22 участвует также в избавлении от патогенов, уже преодолевших эпителиальный барьер,

например, активируя экспрессию IL-18 в энтероцитах для продукции хемокинов и цитокинов, привлекающих иммунные клетки к месту воспаления [84].

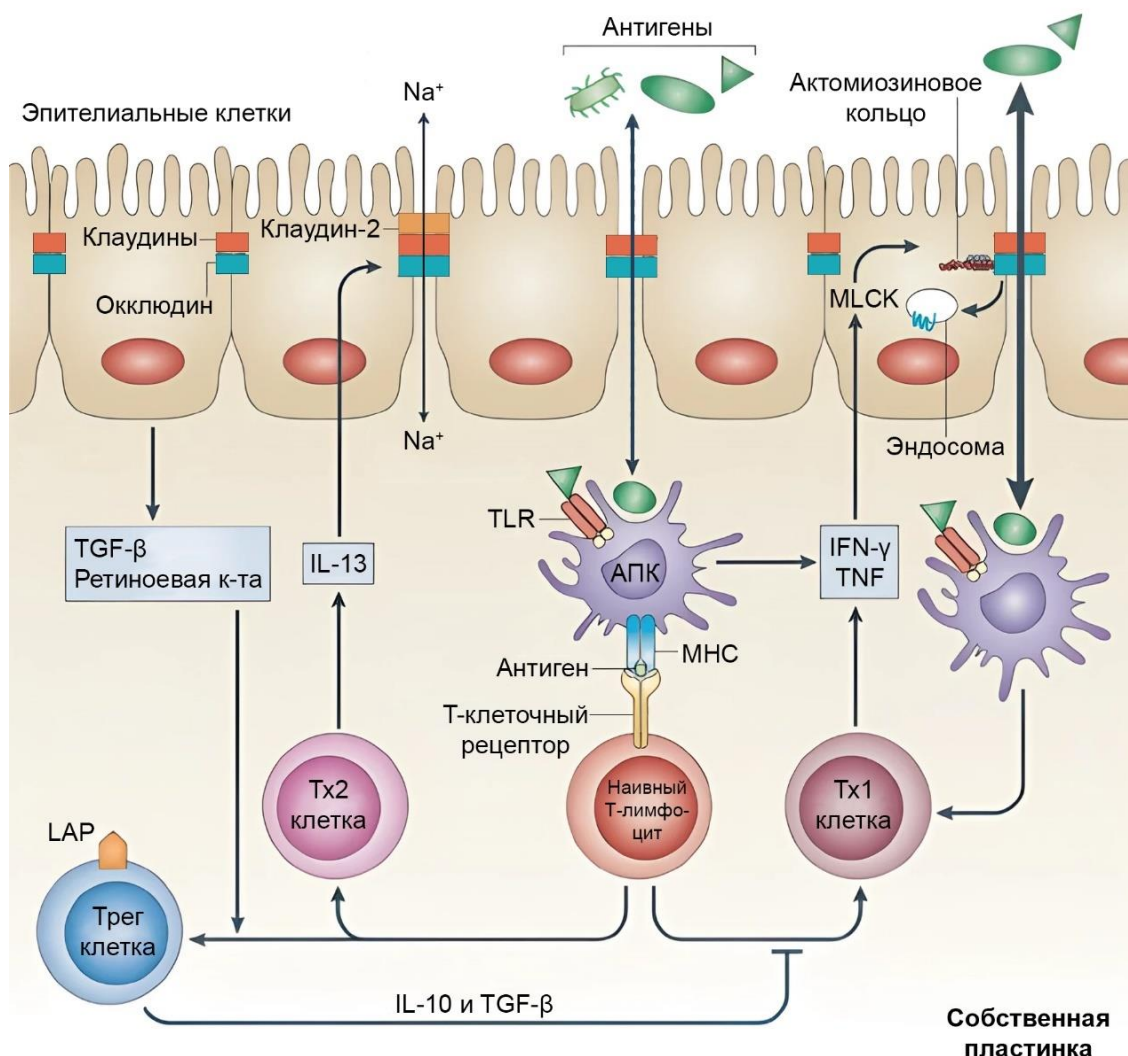


Рисунок 4. Иммунный барьер толстой кишки. АПК – антиген-презентирующие клетки, LAP – пептид, ассоциированный с латентностью, МНС – главный комплекс гистосовместимости, MLCK – киназа легкой цепи миозина; TLR – Toll-подобный рецептор; Tx1,2 – Т-хелперы 1,2, Трег – Т-регуляторные клетки. По [83], с модификациями.

1.2 Нарушения работы кишечного барьера при воспалении

В экспериментальных моделях колита и у пациентов с ВЗК слизистый слой утрачивает часть защитных свойств и становится более проницаемым для бактерий, что может играть решающую роль в этиологии этих заболеваний и, возможно, других кишечных расстройств [27]. Исследования, посвящённые оценке уровня экспрессии гена, кодирующего белок муцин-2, при ВЗК у людей, носят довольно противоречивый характер:

многие исследователи отмечают снижение экспрессии этого гена при язвенном колите, некоторые же не обнаруживают достоверной разницы, или даже отмечают увеличение экспрессии [15]. Тем не менее, исследования, опирающиеся на оценку уровня белка муцина-2, сходятся в том, что его содержание при язвенном колите снижается [15].

В фазе обострения ВЗК возрастает экспрессия порообразующего белка клаудина-2 и его доля в составе ПК, в результате чего усиливается параклеточный транспорт ионов натрия и небольших незаряженных молекул. Напротив, белки клаудин-1, 3, 4, 5, 8 и окклюдин теряют свою характерную локализацию у пациентов с ВЗК; уровень экспрессии соответствующих генов снижается [27, 44]. При активном язвенном колите падает уровень белка трицеллюлина и нарушается барьерная функция кишки; в период ремиссии эти показатели восстанавливаются до нормы [41]. Есть данные, что первичная дисфункция кишечного эпителиального барьера недостаточна для того, чтобы вызвать ВЗК, но может активировать иммунные реакции слизистой оболочки, ускорить возникновение колита и усилить тяжесть симптомов [83, 85].

В состоянии воспаления происходит высвобождение множества молекул, влияющих на состав и стабильность межклеточных контактов. Цитокины в воспалительной среде способствуют изменениям параклеточной проницаемости путем реструктуризации межклеточных соединений [86, 87]. Было показано, что воспалительные цитокины приводят к нарушению функции межклеточных контактов при ВЗК [88–91]. Например, TNF- α снижает экспрессию генов, кодирующих белки клаудин-1, окклюдин и ZO-1 и вызывает изменение локализации белков ZO-1 и окклюдина [92–95].

Интерферон IFN- γ способствует обратимому эндоцитозу эпителиальных трансмембранных белков. Этот процесс контролируется опосредованным Rho-ROCK сокращением актомиозинового цитоскелета в области апикального соединительного комплекса [70]. Кроме того, провоспалительный цитокин TNF- α , также способствует фосфорилированию лёгкой цепи миозина, тем самым участвуя в актомиозиновых сокращениях при воспалении [96].

Опубликованные данные об активности ГТФаз Rho в кишечнике при клинических и экспериментальных ВЗК немногочисленны и противоречивы. В одном исследовании сообщается о существенной активации RhoA в воспаленной слизистой оболочке толстой кишки у пациентов с болезнью Крона и мышей с колитом, индуцированным TNBS (2,4,6-тринитробензолсульфокислота) [97]. Однако более свежее исследование показало, что RhoA инактивирован в эпителии кишки пациентов с ВЗК [71]. Примечательно, что

специфичная для кишечного эпителия делеция либо RhoA, либо фермента, который опосредует пренилирование Rho, приводит к повреждению эпителия и спонтанному воспалению в кишке [71]. С другой стороны, фармакологическое ингибирование ROCK оказывает значительное противовоспалительное действие и ослабляет симптомы колита у мышей [97]. В совокупности эти результаты указывают на двойную роль RhoA в регуляции кишечного эпителиального барьера *in vivo*. Сдвиг баланса либо в сторону инактивации, либо в сторону активации RhoA воспалительными или инфекционными агентами может вызвать повреждение барьера [68].

При вялотекущем воспалении, характерном для пациентов в стадии ремиссии, уровень воспалительных цитокинов не такой высокий, и их влияние частично сдерживается противовоспалительными цитокинами, что порождает вопрос о механизмах изменения проницаемости кишки в таком состоянии. Исследования с участием пациентов, страдающих от болезни Крона, и их условно здоровых ближайших родственников, выявили у вторых генетически обусловленную повышенную проницаемость кишечника, что нельзя объяснить механизмом изменения проницаемости под действием цитокинов [98, 99]. Большое количество данных свидетельствует о том, что у пациентов с ВЗК в ремиссии невоспалённая слизистая имеет повышенную проницаемость [100–103]. Даже после достижения гистологической ремиссии, транскрипционный профиль клеток слизистой не возвращается к уровню нормы [104]. Таким образом, механизмы изменения проницаемости кишечного эпителия в хроническом воспалении требуют дальнейших исследований. Одна из гипотез относительно причин повышения проницаемости кишечника включает изменение метаболизма клеток эпителия в ходе хронического воспаления и нарушения активности микробиоты кишечника [105–107]. В частности, было показано, что поглощение кислорода, активность митохондриального метаболизма, снижение количества масляной кислоты и АТФ могут играть существенную роль в нарушении целостности ПК [106, 108].

1.3 Модели воспалительных заболеваний кишечника

Для изучения эпителиального барьера кишечника используется ряд моделей на лабораторных животных: химически индуцированные (с помощью DSS, TNBS, оксазолон, каррагинана), иммунологически индуцированные (с помощью сальмонеллы, динитрохлорбензола), спонтанные (C3H/HeJ^{Bir}, SAMP1/Yit), нокаутные (*IL2*^{-/-}, *IL10*^{-/-}, *Muc2*^{-/-}, *NOD2*^{-/-}), модели адаптивного переноса (перенос CD45⁺RB^{High} Т-клеток иммунодефицитным животным), трансгенные (HLA-B27, STAT4) [2, 109–111]. В

зависимости от схемы введения агентов, индуцирующих колит, можно получить модели с острой или хронической формой колита; у конститутивных трансгенных моделей развивается хроническое воспаление. В данном разделе будут рассмотрены две экспериментальные модели колита, которые применяются в настоящей работе: DSS-индуцированный хронический колит и генетически-обусловленный дефицитом муцина-2 (Muc2) колит у мышей.

1.3.1 Колит, индуцированный натриевой солью сульфата декстрана

Натриевая соль сульфата декстрана (DSS) – это синтетический сульфатированный полисахарид глюкозы [109]. Добавление DSS в питьевую воду животных вызывает симптомы, напоминающие язвенный колит. Точный механизм развития DSS-индуцированного колита не вполне ясен, но считается, что DSS повреждает муциновый слой и кишечные эпителиальные клетки гиперосмотическим путём. Последние данные свидетельствуют о том, что DSS связывается с поступающими из пищи жирными кислотами со средней длиной цепи, и эти комплексы поглощаются и метаболизируются энтероцитами [112]. Клинические признаки DSS-индуцированного колита в острой фазе проявляются потерей веса, диареей и скрытой кровью в стуле, пилоэрекцией, анемией. Происходит истончение муцинового слоя, апоптоз и некроз эпителия, абсцесс крипт, повышение кишечной проницаемости, изъязвление, отёк подслизистой оболочки, миграция клеток врождённой иммунной системы [113, 114]. При хроническом DSS-индуцированном колите наблюдается гиперплазия крипт, трансмуральное воспаление и активация адаптивного иммунитета: повышенная инфильтрация макрофагов и $CD4^+$ Т-клеток со смешанным иммунным ответом T_H1 и T_H2 лимфоцитов [109, 114]. Воспаление, вызванное DSS, характеризуется повышенной активацией NF- κ B и высокой экспрессией генов воспалительных цитокинов (IL-1, TNF- α , IL-6 и IL-8) [109, 113].

Эффективность и симптомы DSS-индуцированного колита зависят от молекулярной массы соли (5 кДа для легкого и 40 кДа для тяжелого колита), дозировки (обычно 1–5 %), схемы приёма, линии животных (мыши линий C3H/HeJ и Balb/c более восприимчивы), пола (самцы мышей более восприимчивы) и состава кишечной микробиоты [109]. DSS обычно добавляют в питьевую воду в течение 7-10 дней, чтобы вызвать острое воспаление. Хронический колит вызывают, используя схему приёма, состоящую из 3-5 циклов «неделя DSS, неделя питьевой воды». Каждая линия мышей требует подбора индивидуальных условий индукции колита, а именно дозировки, молекулярной массы используемого DSS и длительности потребления [109].

Кишечная микробиота может способствовать облегчению воспаления, вызванного DSS. У мышей, содержащихся в безмикробной среде или принимающих антибиотики, в ответ на DSS развивается колит с активным кровотоком и высокой смертностью [115]. DSS часто используется не в качестве самостоятельной модели колита, но как оценка подверженности мышей с тем или иным фенотипом к развитию колита. Например, DSS значительно увеличивает уровень смертности у мышей с генетически обусловленным дефицитом MyD88 или TLR4 по сравнению с мышами дикого типа. Генетически модифицированных мышей подвергают воздействию DSS, и с использованием этой модели оценивают терапевтический потенциал соединений [115].

Краткосрочное употребление DSS вызывает нарушение метаболизма фосфолипидов, проявляющееся снижением уровня фосфохолина и глицерофосфохолина в толстой кишке мышей [116]. Эти соединения являются ключевыми метаболитами холина и основными компонентами, необходимыми для сборки биологических мембран. Кроме того, в толстой кишке наблюдается заметное снижение содержания нуклеотидов, таких как ЦДФ и АМФ, азотистых оснований и нуклеозидов, таких как урацил и уридин [116]. Острый DSS-индуцированный колит приводит к изменению экспрессии белков ПК и АК, что прямым образом сказывается на проницаемости кишечника. Так, при остром DSS-индуцированном колите снижаются уровни белков ZO-1, окклюдин [117–119], повышаются уровни содержания и локализация в области ПК белков клаудин-1 и 2 [118, 120], снижаются уровни белков клаудина-3, 5, 7, 8 [53, 117, 120, 121], нарушается локализация белков E-кадгерина и β -катенина [122]. Некоторые данные, напротив, свидетельствуют о снижении уровня белка клаудина-1 [119, 121]. DSS-индуцированное нарушение АК и ПК связано с реорганизацией актинового цитоскелета эпителиальных клеток, указывая на то, что DSS воздействует на область актин-миозинового кольца, который взаимодействует с белковыми комплексами межклеточных контактов [122, 123].

Данных о уровне белков ПК и АК в хроническом DSS-колите меньше. При хроническом DSS колите наблюдали снижение экспрессии генов *Ocln*, *Cldn1* [124, 125], *Muc2*, *Tjp1* (ZO-1), *Cdh1* (E-кадгерин), *Cldn3* и повышение экспрессии *Cldn2* [126–129]. У других авторов анализ экспрессии мРНК показал, что уровень транскриптов генов, кодирующих белки окклюдин, муцин-2 и -3 снижены, в то время как экспрессия гена *Tjp1* немного выше в группе с хроническим потреблением DSS [130].

Следует отметить, что у DSS-индуцированной модели колита есть несколько ограничений, особенно при использовании для оценки эффективности потенциальных

лекарств для терапии. Хорошо известно, что тяжесть воспаления значительно варьируется от животного к животному, а также от локализации в отдельной толстой кишке, что затрудняет оценку воспаления по сравнению с другими моделями. Различные протоколы доз DSS (1-5%) и схем приёма (3-7 дней) также влияют на результат. DSS нестабилен в кислых условиях, что может повлиять на эксперимент, в котором животные должны употреблять подкисленную воду. Модель DSS допускает расхождения в данных, поэтому следует уделять особое внимание интерпретации результатов, полученных с её помощью, особенно для оценки терапевтического эффекта препаратов [115].

1.3.2 Трансгенная модель с нокаутом гена *Muc2*

Другой распространенной экспериментальной моделью для изучения воспаления и рака кишки являются мыши с нокаутом гена *Muc2*. У мышей *Muc2*^{-/-} не вырабатывается белок муцин-2 – основной гликопротеин слизистого секрета кишки [131]. Вследствие отсутствия белка муцина-2 эпителиальные клетки кишечника находятся в прямом контакте с микробиотой, что приводит к развитию хронического колита [132]. Нарушения, наблюдаемые у мышей *Muc2*^{-/-}, во многом похожи с симптомами язвенного колита у людей [133]. Колит у мышей с нокаутом гена *Muc2* характеризуется гиперплазией крипт, деформацией бокаловидных клеток, миграцией воспалительных клеток, повышенной экспрессией цитокина TNF-α и локализуется преимущественно в дистальном отделе толстой кишки у мышей в возрасте 5 недель [115]. На фоне отсутствия выработки белка муцина-2 у мышей *Muc2*^{-/-} повышена проницаемость кишечного эпителия [134, 135]. Некоторые литературные данные свидетельствуют о том, что у мышей *Muc2*^{-/-} снижается уровень экспрессии генов *Cldn-1*, *-2*, *-5* и *Ocln*, тогда как уровень экспрессии *Cldn-10a* возрастает [136, 137], другие, напротив, демонстрируют, что в данной модели экспрессия генов, кодирующих белки межклеточных контактов, не отличается от нормы [12].

В энтероцитах мышей с дефицитом белка муцина-2 происходят существенные изменения в путях промежуточного метаболизма, включая метаболизм липидов, повышенную утилизацию глюкозы и стресс ЭПР [133]. Что интересно, сниженная экспрессия генов метаболизма липидов не сопровождается изменениями скорости обмена веществ [133, 138]. В то же время есть свидетельства повышения уровня метаболизма и биосинтеза липидов в микробиоте мышей *Muc2*^{-/-} [139].

Роль липидного метаболизма в развитии воспалительных состояний и повышении проницаемости кишечника представляет особый интерес. В следующем разделе будут рассмотрены липиды и их роль в ВЗК и синдроме повышенной проницаемости кишечника.

1.4 Метаболизм липидов при воспалительных заболеваниях кишечника

Воспалительные цитокины регулируют гены, участвующие в метаболизме глюкозы и липидов, влияя на общий энергетический гомеостаз. Клинические исследования пациентов и работы на животных показали, что хроническое воспаление связано со снижением энергетического обмена и сильным повреждением митохондрий, ЭПР, аппарата Гольджи, а также клеточных и ядерных мембран при воспалении в эпителии кишечника [7]. Это указывает на то, что при колите может быть существенно нарушена регуляция мембраноформирующих фосфолипидов. Действительно, клинические данные свидетельствуют о том, что важные для состава мембран фосфолипиды, такие как фосфатидилхолин, могут подавляться при ВЗК [7]. Нокаут гена *PCYT1A*, кодирующего фермент холинфосфатцитидилтрансферазу, который лимитирует скорость основного пути биосинтеза фосфатидилхолина, приводит к колиту, сопровождающимся истончением слизистого слоя и высокой проницаемостью кишечного барьера [7]. Ультраструктурные изменения в этой мышинной модели напоминают те, которые наблюдаются при нокауте гена *Muc2*, включая форму митохондрий и повреждение микроворсинок [12]. Производные фосфатидилинозитола также участвуют в патогенезе ВЗК в качестве сигнальных молекул. Было показано, что помимо их роли в формировании мембран фосфолипиды действуют отдельно внутри ядра как сигнальные молекулы, играющие важную роль в регуляции экспрессии генов [7]. Многие фосфолипиды непосредственно активируют гены, как лиганды ядерных рецепторов, и регулируют обмен липидов, глюкозы, биосинтез стероидов и пролиферацию клеток. Другой важной ролью фосфолипидов является активация Т-клеток и регуляция иммунного ответа, инфекции и рака. С другой стороны, фосфолипиды могут ухудшать функцию рецепторов, изменяя текучесть мембраны, состав фосфолипидов внутри мембраны или липидных плотов. Некоторые фосфолипиды, такие как фосфоинозитиды, и их модифицирующие ферменты асимметрично распределены в плазматической мембране и служат для различения апикальных функциональных доменов в поляризованных эпителиях [7]. Фосфолипиды различаются по своим физическим и биологически активным свойствам в зависимости от химической структуры, поэтому они могут по-разному влиять на формирование липидных рафтов и процессы разделения фаз, которые являются ключевыми для передачи сигнала и межклеточных взаимодействий. Роль отдельных фосфолипидов в этих процессах еще предстоит изучить.

У больных язвенным колитом снижается количество фосфатидилхолина, что ухудшает гидрофобные и защитные свойства слизистого секрета. Клинические испытания

на пациентах с колитом, направленные на восстановление концентрации этого липида в толстой кишке, показали многообещающие результаты. Снижение уровня фосфатидилхолина при колите может происходить из-за его повышенной деградации посредством активности фосфолипазы A2, которая интенсивно работает у пациентов с ВЗК. В соответствии с этой гипотезой, введение внеклеточного ингибитора фосфолипазы A2 подавляло развитие TNBS-индуцированного колита и положительно влияло на сохранение кишечного барьера [7].

Фосфатидилсерин преимущественно представлен с цитоплазматической стороны мембраны клетки. Перемещаясь на внешнюю сторону клетки, он запускает сигналы, ведущие к апоптозу. ВЗК обычно сопровождается повышенной степенью апоптоза энтероцитов, и фосфатидилсерин играет в этом процессе решающую роль. Липидомное профилирование пациентов с болезнью Крона демонстрирует существенное снижение содержания фосфатидилсерина. Этот липид активирует протеинкиназу C, которая поддерживает целостность кишечного барьера. Снижение уровня фосфатидилсерина может влиять на активацию протеинкиназы C и, следовательно, ухудшать барьерную функцию эпителия в кишечнике [7].

Производные фосфатидилинозитола являются важными вторичными мессенджерами, участвующими в регуляции различных клеточных процессов, включая пролиферацию, организацию цитоскелета, транспорт везикул, транспорт глюкозы и функцию тромбоцитов. Апикально-базальный градиент производных фосфатидилинозитола обеспечивается апикальными соединительными комплексами и несёт важную функциональную нагрузку. Фосфоинозитид-3-киназа (PI3K) является ключевым регулятором пути PI3K/AKT/mTOR. Киназа PI3K регулирует врожденный иммунный ответ в DSS-индуцированной и CD10-нокаутной моделях колита, тем самым контролируя воспаление толстой кишки и образование опухолей. Ген *PI3Kδ* человека относится к ВЗК-ассоциированным локусам. У мышей с дефектом субъединицы p110 PI3Kδ развивается спонтанный колит [7].

Фосфатидная кислота служит предшественником в биосинтезе других фосфолипидов. У млекопитающих фосфатидная кислота регулирует апоптоз и пролиферацию клеток, в частности, посредством пути mTOR. Фосфатидная кислота непосредственно взаимодействует с mTOR в рапамицин-связывающем домене и может регулировать способность mTOR активировать нижестоящие эффекторы [7].

Сфинголипиды опосредуют трансмембранную передачу сигнала, способствуя росту, дифференцировке или гибели клеток, а также поддержанию целостности мембранных

структур. Передача сигналов от воспалительных цитокинов и факторов роста вызывает гидролиз сфингомиелина, что приводит к освобождению биологически активных молекул: церамида, сфингозина и сфингозин-1-фосфата. Воспаление кишечника сопровождается повышением уровня церамидов, а повышенный синтез церамидов способствует тяжести колита. У пациентов с ВЗК уровни церамидов d18:1/24:0 и d18:1/24:2 понижаются в зажившей слизистой, но повышаются по мере прогрессирования заболевания (в номенклатуре церамидов сперва записывается формула сфингоидного основания, например, d18:1 для сфингозина, затем через косую черту указывается длина цепи жирной кислоты и количество двойных связей). В модели DSS-индуцированного хронического колита, уровень церамидов увеличивается на 71%, тогда как в модели переноса CD4⁺CD62L⁺ клеток *Rag1*^{-/-} мышам он возрастает до 160%. Индуцированное экзогенной сфингомиелиназой (СМазой) накопление церамидов в ПК приводит к увеличению проницаемости кишечника. Было продемонстрировано, что TNF- α усиливает выработку церамидов с последующей активацией NF- κ B, что приводит к клеточному апоптозу и замедляет скорость заживления слизистой. Помимо гидролиза сфингомиелинов, накопление церамидов может происходить ещё двумя способами: синтез *de novo*, опосредованный серинпальмитоилтрансферазой, и синтез с участием церамидсинтаз [7].

В зависимости от длины ацильной цепи церамиды оказывают различное воздействие на развитие воспаления. Отсутствие церамидов с очень длинной ацильной цепью (C22 и C24) приводит к более выраженному воспалению в мышинной модели острого колита, вызванного DSS [140]. То же самое наблюдается при отсутствии церамида C16 в случае DSS-индуцированного, но не иммунологически-индуцированного колита [141]. Повышенный уровень церамида C14 вызывает стресс ЭПР и хронические воспалительные реакции. Снижение уровня церамида C24 снижает экспрессию белков ПК и индуцирует фосфорилирование легкой цепи миозина 2, что приводит к повышению проницаемости кишечника.

Ещё одна интересная роль сфингомиелинов связана с обновлением кишечного эпителия. Недавние исследования показали, что в физиологически здоровых условиях сращивание эпителия запускается растяжением эпителиальной клетки, что обнаруживается по активации чувствительного к растяжению катионного канала Piezo. Белки ПК перераспределяются и окружают погибающую клетку, чтобы заполнить зазор, оставшийся после сращивания, тем самым поддерживая барьер. Такое перераспределение запускает путь передачи сигнала с участием сфингозин-1-киназы, рецептора сфингозин-1-фосфата и

ROCK [142]. Этот механизм позволяет поддерживать целостность барьера в местах сближения клеток [27].

Воздействие на биосинтез керамидов выглядит перспективно с точки зрения лечения пациентов с ВЗК. Фармакологическое ингибирование кислой СМазы полностью устраняет индукцию разрушающей внеклеточное вещество матричной металлопротеиназы с помощью цитокинов TNF и IL-1 β в клетках Caco-2 (клетки колоректальной карциномы человека) и фибробластах кишки человека. Другой ингибитор этой СМазы, SMA-7, снижает выработку керамидов, индукцию NF- κ B, высвобождение воспалительных цитокинов макрофагами и улучшает клиническую картину DSS-индуцированного воспаления у мышей. Интерес представляет также FTY720 – ингибитор рецептора сфингозин-1-фосфата. Эта молекула блокирует активацию NF- κ B/IL-6/STAT3 пути и подавляет развитие рака, связанного с колитом. Таким образом, дальнейшее изучение роли отдельных керамидов представляется интересным в контексте патогенеза и лечения различных аспектов ВЗК.

1.5 Заключение

Основой защитного барьера кишечника являются белковые комплексы плотных и адгезивных контактов, которые обеспечивают регуляцию проницаемости однослойного поляризованного эпителия кишечника. Они связаны с микрофиламентами, расположенными под плазматической мембраной клеток эпителия кишки. Механизмы взаимодействия между мембраной, микрофиламентами и комплексами межклеточных контактов являются ключевым аспектом в изучении механизмов регуляции проницаемости кишечного барьера.

Синдром повышенной проницаемости кишечника в остром воспалении достаточно хорошо изучен. Есть множество данных, подтверждающих, что при обострении колита меняется экспрессия генов, кодирующих белки плотных контактов: клаудины, ZO-1, окклюдина [117, 120, 121]. Это справедливо и для белков адгезивных контактов: E-кадгерина и β -катенина [122]. Кроме того, наблюдается изменение структуры актинового цитоскелета, который служит основанием для закрепления комплексов плотных и адгезивных контактов [122, 123]. В норме реорганизация цитоскелета и комплексов межклеточных контактов способствуют выходу иммунных клеток на поверхность слизистой для обеспечения защиты от антигенов, угрожающих организму [83]. В состоянии повышенной проницаемости происходит нарушение регуляции процессов миграции иммунных клеток.

В то же время, изменения кишечного барьера в хроническом воспалении изучены недостаточно. Данные об экспрессии генов белков межклеточных контактов противоречивы и разнятся в зависимости от модели. На сегодняшний день терапевтические стратегии лечения в отношении пациентов с ВЗК в основном ограничиваются достижением пациентами стабильной ремиссии с помощью противовоспалительных препаратов и антибиотиков без возможности полного излечения [7]. Наиболее сложные пациенты нуждаются в хирургическом вмешательстве, что не избавляет от причины заболевания, сохраняя риск рецидива. Таким образом, существует необходимость изучения механизмов развития синдрома повышенной проницаемости кишечного барьера, как основополагающего функционального нарушения при ВЗК.

Одним из первых и до сих пор активно используемых подходов к моделированию колита у мышей является химически-индуцированное воспаление. Для этого используют химические вещества, которые повреждают слизистый барьер и могут вызывать острое и хроническое воспаление в зависимости от схемы потребления, например, натриевая соль сульфата декстрана (dextran sulfate sodium, DSS), 2,4,6-тринитробензолсульфоновая кислота (2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid, TNBS), оксазолон [113]. Другой способ получения экспериментальных моделей стал возможен благодаря трансгенным животным: в настоящее время существует более 70 моделей, в которых нарушены функции генов, вовлеченных в патогенез ВЗК [81]. У мышей с нокаутом гена *Muc2* развивается хроническое воспаление кишечника, сопровождающееся нарушением функции плотных контактов. Ранее были опубликованы данные, что у таких животных нарушена организация микрофиламентов, играющих важнейшую роль в формировании щеточной каёмки и плотных и адгезивных контактов [12]. Кроме того, нокаут гена *Muc2* вызывает нарушение структуры митохондрий в клетках толстого кишечника [12].

Настоящая работа нацелена на исследование особенностей нарушения барьера толстой кишки в моделях хронического колита. Основным фокусом исследования стало взаимодействие F-актина с межклеточными контактами, а также выявление роли липидного метаболизма в процессах, способствующих повышению проницаемости эпителиального барьера. В работе были использованы две модели хронического колита *in vivo*: трансгенная (мыши с нокаутом гена *Muc2*) и химически-индуцированная (DSS-индуцированный колит), для выявления универсальных закономерностей и получения воспроизводимых результатов.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТОВ

2.1 Модели и экспериментальные животные

Исследования проводились на лабораторных мышах, содержащихся в секторе разведения экспериментальных животных Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт нейронаук и медицины» (НИИНМ СО РАН, г. Новосибирск). Все процедуры с животными осуществлялись в соответствии с законодательством Российской Федерации о правилах лабораторной практики (приказ Минздрава России № 267 от 19.06.2003 г.) и положениями Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (ETS №. 123). Исследования на животных были одобрены биоэтической комиссией Института молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук (ИМКБ СО РАН, г. Новосибирск), протокол №02/21 от 04 августа 2021 года и биоэтической комиссией Института нейронаук и медицины Сибирского отделения Российской академии наук (НИИНМ СО РАН, г. Новосибирск), протокол №3 от 19 мая 2022 года.

В качестве животных дикого типа использовали линию мышей C57BL/6JNskrc (домашняя линия на базе генотипа C57BL/6J). C57BL/6JNskrc (далее C57BL/6) были получены из замороженных эмбрионов C57BL/6J, подсаженных псевдобеременным самкам линии CD-1. Для моделирования хронического воспаления кишечника использовали трансгенных мышей с нокаутом гена *Muc2* и мышей C57BL/6, употреблявших натриевую соль сульфата декстрана (DSS). Животных содержали в стандартных условиях конвенционального вивария. В помещении поддерживалось искусственное освещение со светлой и тёмной фазами длительностью по 12 часов, комнатная температура; корм (Прокорм, Россия) и вода предоставлялись без ограничений, если того не требовали условия эксперимента. Взрослых особей в возрасте 12-14 недель содержали группами однополых однопомётников в клетках с березовыми опилками в качестве подстила. Были приложены все усилия для минимизации числа животных в эксперименте и их страданий. Эвтаназия проводилась методом краниоцервикальной дислокации, которую выполнял квалифицированный специалист с опытом работы с лабораторными животными не менее двух лет.

2.1.1 Трансгенная модель с нокаутом гена *Muc2*

Мыши с нокаутом гена *Muc2* (*Muc2*^{-/-}) были получены методом редеривации ранее созданной трансгенной линии *Muc2*^{tm1Avel} / *Muc2*^{tm1Avel} [131], в которой экзоны 2-4 гена *Muc2* заменены на PGK-Neo кассету. Редеривация проводилась с использованием самок линии CD-1, с последующим обратным скрещиванием с животными C57BL/6. *Muc2*^{-/-} мыши и их однопометники дикого типа (мыши *Muc2*^{+/+}) были получены путем скрещивания самок и самцов генотипа *Muc2*^{+/-}. Однопомётники дикого типа *Muc2*^{+/+} использовались в качестве контроля в экспериментах с животными *Muc2*^{-/-} с целью исключить влияние микрофлоры на исследуемые параметры.

2.1.2 DSS-индуцированная модель хронического колита

Для моделирования химически индуцированного колита использовали самцов линии C57BL/6J. Контрольная группа (n = 6) пила обычную воду, опытной группе (n = 6) предоставлялся раствор 2% натриевой соли сульфата декстрана 40 кДа (DSS, NeoFroxx, Германия) в питьевой воде. Через семь дней все растворы 2% DSS заменяли свежей питьевой водой еще на семь дней. Цикл повторяли трижды, что в сумме составило шесть недель эксперимента (42 дня). Для оценки динамики воспалительного процесса животных взвешивали дважды в неделю. На 43-й день после начала эксперимента проводили забор образцов ткани толстой кишки, которые фиксировали в 10% нейтральном формалине для последующего гистологического анализа.

2.2 Введение фосфолипидов в диету мышей

Обогащенный фосфолипидами корм готовили на основе стандартного гранулированного корма (Прокорм, Россия) с добавлением 840 мг фосфатидилхолина (Solgar, США), 100 мг фосфатидной кислоты и 100 мг фосфатидилсерина (4+NUTRITION, Италия) на каждые 30 г корма. Долгосрочное кормление фосфолипидами осуществлялось путем перевода беременных самок C57BL/6 на обогащённый фосфолипидами корм, начиная с первого дня после оплодотворения самцом. Рожденное потомство содержалось на такой же диете до возраста около 12 недель. В дальнейший эксперимент включались только самцы. Для оценки эффектов краткосрочного воздействия фосфолипидов использовали 8-недельных самцов C57BL/6J, которым в течение 14 дней предоставлялся корм, обогащённый фосфолипидами.

2.3 Приготовление гистологических срезов толстой кишки

Фрагменты нисходящей толстой кишки фиксировали в течение ночи в 10% растворе нейтрального забуференного формалина (Элемент, Россия). Далее образцы подвергали криозащите: сначала в течение 12 часов инкубировали в 15% растворе сахарозы в фосфатно-солевом буфере (PBS, Панекко, Россия), затем – ещё 12 часов в 30% растворе сахарозы в PBS. Пропитанные сахарозой образцы заливали в формах реагентом O.C.T. Compound (Tissue-Tek, США) и замораживали в жидком азоте. Срезы толщиной 40 мкм получали с использованием криостата Leica CM1850 UV (Leica Biosystems, Германия). Готовые препараты на стёклах замораживали при -20°C до момента проведения дальнейших процедур.

2.4 Иммуногистохимический анализ

Иммуногистохимическое окрашивание осуществлялось по протоколу, описанному в [12]. Срезы толстой кишки, а также зафиксированные в 10% растворе нейтрального забуференного формалина органоиды и экспланты помещали в блокирующий раствор (0,5% бычий сывороточный альбумин (БСА) и 0,3% Triton X-100 в PBS) на 2 часа при 4°C. Инкубацию в растворе первичных антител в блокирующем растворе проводили в течение ночи при 4°C. Первичные антитела разводили в отношении 1:100. После трёхкратной промывки PBS по 5 мин добавляли раствор вторичных антител, разведённых в блокирующем растворе в отношении 1:500, инкубация длилась 2 часа при комнатной температуре. Перечень использованных первичных и вторичных антител приведён в Таблице 1. Для окрашивания F-актина использовали 0,15 мкг/мл Alexa Fluor 568 Phalloidin (ThermoFisher Scientific, США) в PBS. Для визуализации клеточных ядер использовали 0,15 мкг/мл DAPI (HiMedia, Индия) в PBS. Образцы размещали на предметных стёклах в 50% растворе глицерина в 1×PBS и накрывали покровным стеклом. Препараты хранились в темноте при 4°C.

Таблица 1. Антитела, используемые для иммунофлюоресцентного окрашивания.

Первичное антитело	Соответствующее вторичное антитело
ZO-1 Rabbit IgG Polyclonal Antibody (кат. № 61-7300, Invitrogen, США)	Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Highly Cross Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488 (кат. № A-11034, Invitrogen, США)

Первичное антитело	Соответствующее вторичное антитело
Claudin 7 Mouse IgG Monoclonal Antibody (кат. № 37-4800, Invitrogen, США)	Goat anti-Mouse IgG (H+L) Highly Cross Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488 (кат. № A-11001, Invitrogen, США)
Anti-β-Catenin Mouse IgG1 Monoclonal Antibody (кат. № #610153, BD Transduction Laboratories, США)	Goat anti-Mouse IgG (H+L) Highly Cross Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488 (кат. № A-11001, Invitrogen, США)
JAM-A Antibody (кат. № AF1077, R&D Systems, США)	Donkey anti-Goat IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor™ 488 (кат. № A-11055, Invitrogen, США)
CD324 (E-cadherin) Antibody (кат. № 14-3249-82, Invitrogen, США)	Goat anti-Rat IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488 (кат. № A-11006, Invitrogen, США)

Препараты после иммуноокрашивания снимали на конфокальном микроскопе LSM 710 (Carl Zeiss, Германия) с программным обеспечением ZEN 2012, используя идентичные настройки мощности лазера, параметры захвата изображения и сохранения. Количественная оценка интенсивности флуоресценции проводилась на 11 последовательных оптических срезах, объединённых в трёхмерную реконструкцию толщиной 2,412 мкм методом максимальной интенсивности. Измерения проводились с использованием программного обеспечения ImageJ. Интенсивность сигнала меченных белков плотных и адгезивных контактов оценивали вдоль латеральных мембран энтероцитов, локализованных в апикальной зоне крипт. Для F-актина измерения проводились отдельно вдоль щёточной каёмки и вдоль латеральных мембран. Замеры выполнялись вдоль апикальной трети латеральной мембраны с помощью криволинейной области интереса; регистрировалась средняя интенсивность флуоресценции пикселей в данной области. Значение фонового сигнала, измеренного в зоне отсутствия специфической окраски, вычиталось из каждого значения. Для каждой экспериментальной группы выполняли не менее 100 независимых измерений. Конфокальная микроскопия осуществлялась на базе ИМКБ СО РАН.

2.5 Выделение крипт толстой кишки

Выделение крипт для культивирования органоидов осуществлялось по протоколу, основанному на использовании коллагеназы I, согласно методике, описанной в [143]. Извлечённую нисходящую толстую кишку тщательно промывали в холодном фосфатно-солевом буфере Дульбекко без ионов Ca^{2+} и Mg^{2+} (DPBS, Sigma-Aldrich, США), в который был добавлен 1% антибиотик-антимикотик (АБМ) (Gibco, США). Затем кишку разрезали вдоль, нарежали на небольшие фрагменты и помещали в 1 мл раствора коллагеназы I (Sigma-Aldrich, США) с концентрацией 2 мг/мл в среде DMEM/F12 (Sigma-Aldrich, США) с 10% фетальной бычьей сывороткой (ФБС) и 1% АБМ. Инкубацию проводили в течение 40 мин при 37 °C и 5% CO_2 . После интенсивного взбалтывания полученную суспензию фильтровали через нейлоновый фильтр с размером пор 70 мкм. Фильтрат центрифугировали (250 g, 5 мин, 4 °C), осадок ресуспендировали в среде DMEM/F12, содержащей 10% ФБС и 1% АБМ. Все этапы, за исключением ферментативной обработки коллагеназой, выполнялись на льду в боксе микробиологической безопасности II класса (Lamsystems, Россия). Оценку количества выделенных крипт проводили методом ручного подсчёта в камере Горяева с использованием фазово-контрастной микроскопии.

Выделение крипт для вестерн-блоттинга и метаболомного анализа осуществлялось по протоколу, включающему использование этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) и дитиотреитола (ДТТ), согласно [144]. После промывания толстой кишки PBS ткань разрезали вдоль, фрагментировали и помещали в 15 мл раствора, содержащего 3 мМ ЭДТА (Sigma-Aldrich, США) и 1 мМ ДТТ (Sigma-Aldrich, США) в PBS. Инкубация проводилась при 37 °C в течение 30 мин. После интенсивного взбалтывания полученную суспензию фильтровали через нейлоновый фильтр с размером пор 70 мкм. Полученную суспензию осаждали (250 g, 5 мин, 4 °C), осадок ресуспендировали в среде DMEM/F12, содержащей 10% ФБС и 1% АБМ. Все процедуры, кроме инкубации с ЭДТА-ДТТ в PBS, проводили на льду в боксе микробиологической безопасности II класса (Lamsystems, Россия).

2.6 Культивирование крипт толстой кишки

Посев крипт толстой кишки на подложку из матрикса проводили, как описано в [12, 145, 146]. Выделенные крипты ресуспендировали в питательной среде Intesticult (Stemcell Technologies, Канада), содержащей 1% АБМ. Около 2000-3000 крипт в 500 мкл среды Intesticult высевали в лунку 24-луночного планшета, предварительно покрытую пленкой матрикса Cultrex (R&D Systems, США) согласно инструкции производителя, и

инкубировали в течение 1, 2 и 3 часов при 37°C, 5% CO₂. После инкубации среду с криптами собирали, отбирали 50 мкл суспензии для оценки жизнеспособности с помощью окрашивания 0,1 мкг/мл DAPI, а оставшиеся крипты осаждали центрифугированием при 270 g, 4°C и фиксировали в 10% растворе формалина для иммуногистохимического анализа.

2.7 Культивирование эксплантов толстой кишки

Культивирование эксплантов осуществлялось по протоколу, адаптированному из [147]. Извлечённую нисходящую толстую кишку тщательно промывали в холодном буфере DPBS без ионов Ca²⁺ и Mg²⁺, в который был добавлен 1% АБМ. После промывания толстую кишку разрезали продольно и нарежали на фрагменты размером около 0,5×0,5 см. Затем фрагменты толстой кишки промывали три раза холодным DPBS для удаления клеточного детрита. С помощью тонких пинцетов под бинокулярным микроскопом с эксплантов удаляли мышечный слой, процедура проводилась на замороженном холодильном агенте. Подготовленные экспланты инкубировали на поверхности среды Intesticult с 1% АБМ. Для фиксации ткани на поверхности среды в 24-луночный планшет (TPP, Швейцария) вставляли мини-фильтры для клеток с нейлоновой сеткой (размер пор 100 мкм). Инкубацию проводили при 37 °C в атмосфере, содержащей 5% CO₂, в течение времени от 1 до 30 часов (1 ч, 3 ч, 6 ч, 12 ч, 18 ч, 24 ч, 30 ч). По окончании каждого временного интервала экспланты фиксировали в 10% формалине и подвергали иммуногистохимическому анализу.

2.8 Культивирование органоидов, полученных из крипт толстой кишки

Культивирование органоидов осуществлялось в соответствии с протоколом, описанным в [143]. В каждую лунку 48-луночного планшета (TPP, Швейцария) высевали около 50-100 крипт. Необходимое количество крипт ресуспендировали в 50% растворе Matrigel (Corning, США) в среде Intesticult и полученную суспензию наносили по 15 мкл на лунку. После нанесения капель планшеты переворачивали и инкубировали при 37 °C в течение 5-10 мин до полимеризации матрикса. Затем в каждую лунку добавляли по 300 мкл среды Intesticult с 1% АБМ. Культуры инкубировали в стандартных условиях (37 °C, 5% CO₂), замену среды проводили каждые два дня. Морфологию органоидов оценивали с помощью инвертированного светового микроскопа Axio Vert.A1 (Carl Zeiss, Германия). Для сбора органоидов разрушали капли матрикса путём пипетирования в среде DMEM/F12. Пластиковые пробирки и наконечники перед работой обрабатывали 10% БСА в PBS с целью предотвратить налипание органоидов на пластик. Полученную суспензию

органовидов центрифугировали при 4 °С, на 500 g 5 мин. Осадок использовали для дальнейших анализов.

2.9 Вестерн-блоттинг

Крипты нисходящей толстой кишки, выделенные методом ЭДТА-ДТТ (раздел 2.5), лизировали в буфере, содержащем: RIPA (150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0,5% дезоксихолат натрия, 0,1% SDS, 25 mM трис (pH 7,4), 1 mM метабисульфит натрия, 1 mM дитиотреитол, 1 mM фенилметилсульфонилфторид) с использованием пластиковых пестиков. Лизаты центрифугировали при 12000 g при 4 °С в течение 30 мин, супернатанты собирали и использовали для количественного определения концентрации белка. Нормализованные образцы смешивали в соотношении 1:1 с двукратным буфером Лэммли (62,5 mM Tris-HCl (pH 6,8), 2% SDS, 25% глицерин, 0,01% бромфенолового синего, 5% β-меркаптоэтанол) и денатурировали при 95 °С в течение 5 минут. Электрофоретическое разделение белков (40 мкг белка на дорожку) проводили в 15% полиакриламидном геле в денатурирующих условиях с использованием камеры для вертикального электрофореза (Bio-Rad, США). Состав электродного буфера: 2,5 mM Трис-HCl; 1,92 mM глицин; 0,01% SDS. В качестве маркера использовали стандарт PageRule Prestained Protein Ladder 10–170 кДа (ThermoFisher Scientific, США).

Разделенные в полиакриламидном геле белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану (размер пор 0,2 мкм) (Bio-Rad, США). Мокрый перенос белков с геля на нитроцеллюлозную мембрану осуществляли в буфере для переноса (2,5 mM Трис-HCl; 19,2 mM глицин; 20% метанол) при постоянном токе 250 мА 1,5 часа. Далее мембрану блокировали в растворе PBST (0,1% Triton-X100 в PBS), содержащем 5% сухого молока и 5% БСА 30 мин при комнатной температуре. Инкубацию мембраны с первичными антителами к белкам Е-кадгерин и β-катенин (Таблица 1) проводили в течение ночи при 4°С. После трехкратной промывки в растворе PBST мембраны инкубировали с вторичными антителами (антитела козы против мыши IgG, разведение 1:3500, кат. № G-21040, Invitrogen, США; антитела козы против крысы IgG, разведение 1:3500, кат. № FNSA-0015, FineTest, Китай), конъюгированными с пероксидазой хрена (HRP-конъюгаты), при комнатной температуре 1 час.

Детекция производилась после трехкратной промывки мембран раствором PBST с использованием набора реагентов «Novex® ECL» (Invitrogen, США) и системы для хемилюминесцентной детекции Amersham™ Imager 600 (GE HealthCare, Великобритания)

2.10 Ректальное введение веществ мышам

Анестезию лабораторных животных осуществляли путём внутрибрюшинного введения домитора (Orion Pharma, Финляндия) в дозе 0,05 мг/мл на грамм массы тела и золетила (Valdepharm, Франция) в дозе 5 мг/мл на грамм массы тела. После достижения стадии наркоза, мышам ректально вводили 33 мкл раствора, содержащего одно из следующих веществ: 15 мкМ латрункулин А (Stemcell Technologies, Канада), 3 мкМ джасплакинолид (Santa Cruz Biotechnology, США), 20 мкМ фумонизин В1 (Stemcell Technologies, Канада), 0,5 мМ мицелл церамида С6 (Avanti Lipids, США). Все вещества растворяли в физиологическом растворе 0,9% NaCl. Животным контрольной группы вводили ректально 33 мкл 0,9% раствора NaCl. После введения препарата животных размещали в положении лёжа на спине на подогреваемой платформе (37 °C) с приподнятым тазовым отделом для предотвращения вытекания раствора. После пробуждения животных возвращали в их домашние клетки. Через 3-12 часов (3 часа для латрункулина А и джасплакинолида, 12 часов для фумонизина В1 и мицелл церамида С6) после ректального введения проводили эвтаназию и извлекали нисходящую толстую кишку для иммуногистохимического анализа.

2.11 Просвечивающая электронная микроскопия

Анестезию лабораторных животных осуществляли путём внутрибрюшинного введения домитора (Orion Pharma, Финляндия) в дозе 0,05 мг/мл на грамм массы тела и золетила (Valdepharm, Франция) в дозе 5 мг/мл на грамм массы тела. После достижения стадии наркоза животное закрепляли на столике, вскрывали грудную полость, фиксировали иглу в левом желудочке сердца, рассекали правое предсердие и проводили перфузию через систему кровообращения: сначала 60 мл 0,1 М фосфатного буфера (pH 7,4), затем 60 мл 12,5% раствора глутарового альдегида (Sigma, США) в том же буфере. В каждой экспериментальной группе было задействовано по 2 животных.

Образцы нисходящей толстой кишки помещали в 2,5% раствор глутарового альдегида в 0,1 М буфере какодилата натрия (pH 7,4) на 1 час при комнатной температуре, промывали и контрастировали в 1% OsO₄ (Electron Microscopy Sciences, США) с 0,8% K₃[Fe(CN)₆] в течение 1 часа. Образцы помещали на ночь в 1% раствор уранилацетата (Electron Microscopy Sciences, США) в воде mQ при 4°C, затем обезвоживали путём проводки по градиенту концентрации спиртов (30%, 50%, 75%, 100%) и заливали эпоксидной смолой Epon 812 (Electron Microscopy Sciences, США). Ультратонкие (70 нм) срезы для

просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) получали алмазным ножом (Diatome, Швейцария) на ультрамикротоме Leica EM UC7 (Leica Biosystems, Германия), а затем исследовали с помощью просвечивающего электронного микроскопа JEM1400 (JEOL, Япония). Фотографии обрабатывали с помощью Adobe Photoshop CC 2018 с использованием настроек яркости и контраста. Подготовка срезов и ПЭМ выполнялась в центре коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов (ИЦиГ СО РАН, г. Новосибирск). Фиксацию, дегидратацию и заливку проводили в Секторе структурной клеточной биологии ИЦиГ СО РАН.

Морфометрические измерения проводились в эпителиальных клетках апикальной (ближайшей к просвету) части крипт толстой кишки. Для статистического анализа морфологические структуры измеряли с помощью программного обеспечения ImageJ на случайно выбранных срезах (от 30 до 100 независимых измерений на группу для каждой структуры). Снимки для морфометрического отчёта были зашифрованы независимым исследователем. Для оценки ширины просвета плотных контактов проводили три независимых измерения на один контакт. Для оценки ширины адгезивных контактов производили 7-10 независимых измерений на один контакт. Плотность крист митохондрий оценивали в расчёте на $0,25 \text{ мкм}^2$ митохондриального матрикса. Диаметр липидных капель измеряли только для структур, локализованных внутри митохондрий.

2.12 Измерение скорости потребления кислорода

Оценку биоэнергетических профилей клеток проводили с использованием анализатора Seahorse XF24 (Agilent Technologies, США) согласно методике [145]. За сутки до анализа планшет с картриджем XF 24 (Agilent Technologies, США) гидратировали путем инкубации в течение ночи с раствором XF Calibrant (Agilent Technologies, США) в объёме 200 мкл на лунку при 37°C в инкубаторе без CO_2 . За 30 мин до начала анализа в порты картриджа XF 24 загружали ингибиторы дыхания митохондрий (Agilent Technologies, США), а именно 50 мкМ олигомицин (конечная концентрация 5 мкМ), 50 мкМ FCCP (карбонилцианид п-трифторметоксифенилгидразона, конечная концентрация 5 мкМ) и 50 мкМ ротенон /антимycin A (конечная концентрация 5 мкМ) в соответствии с протоколом, предоставленным производителем. В качестве среды использовали Seahorse-ADF (Agilent Technologies, США): 17,5 мМ глюкозы, 2 мМ L-глутамина, 1 мМ натриевого пирувата, 1% пенициллин-стрептомицин в DMEM (Agilent Technologies, США); pH доводили до 7,4 раствором 3 М KCl, фильтровали через $0,22 \text{ мкм}$

PVDF-фильтр (Jet Biofil, Китай). Для закрепления крипт использовали 8-луночные планшеты Seahorse XFp, предварительно обработанные матриксом Matrigel (10 мкл, разбавленный 1:40 в DMEM/F12). 50 мкл суспензии крипт высевали в лунки планшета и инкубировали 45 мин при 37°C без CO₂. Затем добавляли 180 мкл среды Seahorse-ADF и начинали эксперимент с использованием программы MitoStress Test (Agilent Technologies, США): Calibrate; Equilibrate; Loop start: 3× Mix: 3 min, Measure: 3 min, Loop end; Inject: port A (oligomycin, 50 µM), Loop start: 3× Mix: 3 min, Measure: 3 min, Loop end; Inject: port B (FCCP, 50 µM), Loop start: 3× Mix: 3 min, Measure: 3 min, Loop end; Inject: port A (Rotenone/antimycin A, 50 µM), Loop start: 3× Mix: 3 min, Measure: 3 min, Loop end; End. Аликвоты крипт были собраны из каждого образца для нормализации скорости потребления кислорода (oxygen consumption rate, OCR) [148].

Для оценки жизнеспособности клеток крипты инкубировали либо в среде Seahorse-ADF, либо в той же среде с добавлением 5 мкМ олигомицина в течение 15 мин с последующим добавлением FCCP до 5 мкМ (конечная концентрация) в течение еще 15 мин при 37°C. Затем крипты разбивали на отдельные клетки путем встряхивания в течение 15 мин при 3000 об/мин, окрашивали 0,4% раствором трипанового синего и использовали для подсчёта доли мёртвых клеток в автоматическом счетчике клеток Countess 3 (ThermoFisher Scientific, США).

2.13 Функциональный тест на проницаемость кишечника *in vivo*

Проницаемость кишечника измеряли с использованием 4 кДа FITC-декстрана (Sigma-Aldrich, США). Каждая группа состояла из 10 животных. FITC-декстран вводили перорально в объёме 100 мкл (20 мг/мл в PBS) с использованием металлического зонда. Через 4 часа после введения осуществляли забор крови методом декапитации. Образцы крови разводили в два раза PBS, содержащем 0,5% гепарина, и центрифугировали при 250 g в течение 15 мин. Из полученного супернатанта отбирали 100 мкл и переносили в лунки 96-луночного планшета для измерения флуоресценции на приборе TriStar LB 941 (Berthold Technologies, Германия). Фоновый уровень флуоресценции плазмы крови определяли у мышей после перорального введения эквивалентного объема PBS (3 животных для каждой группы) и вычитали из сигнала, полученного от экспериментальных животных (n = 7-10). Концентрации FITC-декстрана в плазме определяли по калибровочной кривой, построенной на основе серийных разведений стандартного раствора FITC-декстрана в PBS.

2.14 Функциональный тест на проницаемость органоидов

Двухнедельные органоиды собирали из лунок, разбивая матрикс пипетированием, и осаждали с помощью центрифугирования 5 мин при 300 g. Полученный осадок ресуспендировали в среде DMEM/F12, содержащей 1,25 мкМ 4 кДа FITC-декстрана и 1 мг/мл Hoechst 33342 (ServiceBio, Китай). В экспериментальные пробирки дополнительно добавляли 15 мкМ латрункулина А или 1,5 мкМ джасплакинолида для оценки влияния данных веществ на барьерную функцию. Через 1 час инкубации органоиды исследовали с использованием конфокального лазерного сканирующего микроскопа LSM 780 (Carl Zeiss, Германия) и программного обеспечения ZEN 2012 в центре коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов (ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия). В процессе съемки органоиды содержались в специализированной камере при 5% CO₂, 37 °C.

Для анализа отбирали исключительно сферические органоиды без криптовидных выростов и структурных дефектов. Количественную оценку накопления FITC-декстрана в просвете органоида проводили с использованием программного обеспечения ImageJ. Относительную флуоресцентную интенсивность рассчитывали по формуле: относительная интенсивность = внутренняя интенсивность / (внешняя интенсивность + внутренняя интенсивность)

2.15 Метаболомный анализ крипт толстой кишки методом жидкостной хроматографии и тандемной масс-спектрометрии

Для метаболомного профилирования использовали крипты толстой кишки мышей, выделенные с применением ЭДТА-ДТТ (раздел 2.5). После выделения образцы немедленно замораживали в жидком азоте. От каждой пробы дополнительно отбирали аликвоту (1/10 объема) для последующего определения общего белка и нормализации результатов анализа. Замороженные образцы отправляли на сухом льду в Центр коллективного пользования передовой масс-спектрометрии Сколковского института науки и технологий (Сколтех, г. Москва). Нетаргетный метаболомный анализ проводился с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с тандемной масс-спектрометрией. Образцы гомогенизировали на холоде, экстракцию метаболитов осуществляли с помощью 80% раствора метанола. Полученные экстракты высушивали, затем повторно растворяли в 20% растворе ацетонитрила и разделяли методом жидкостной хроматографии.

Спектральные данные аннотировали с использованием общедоступных баз данных метаболитов HMDB (Human Metabolome Database) и LipidMaps [149, 150]. Обработка метаболомных данных осуществлялась с использованием онлайн-платформы MetaboAnalyst 5.0 [151]. На этапе препроцессинга данные были нормализованы по медиане, логарифмированы ($\log_{10}$) и подвергнуты масштабированию по методу Парето. Для выявления наиболее затронутых метаболитов использовали анализ кратности изменения (fold change) и t-критерий Стьюдента. Для оценки различий между группами был проведён анализ главных компонент (principal component analysis, PCA). В дополнение оценивали степень обогащения метаболических путей с применением базы KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) [152].

2.16 Выделение тотальной РНК и обратная транскрипция

Извлечённую нисходящую толстую кишку тщательно промывали в холодном DPBS (Sigma-Aldrich, США), в который был добавлен 1% антибиотик-антимикотик (АБМ) (Gibco, США). К каждому образцу добавляли реагент «ЛИРА» (Биолабмикс, Россия) и выполняли процедуру выделения тотальной РНК согласно инструкции производителя. Геномную ДНК (гДНК) удаляли при помощи обработки образцов ДНКазой I (10 U/ μ l) (Roche, Швейцария) в соответствии с инструкцией производителя. После концентрацию РНК измеряли на спектрофотометре NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, США), и по соотношению A260/A280 (в норме $\geq 1,9$) оценивали чистоту выделенного образца. Чистоту и качество полученной тотальной РНК также проверяли при помощи электрофореза в 1% агарозном геле на 1×TAE.

Синтез комплементарной ДНК (кДНК) проводили методом обратной транскрипции с использованием M-MuLV обратной транскриптазы (SibEnzyme, Россия), согласно инструкции производителя. 1,5 мкг тотальной РНК, растворенной в 11 мкл стерильной воды, очищенной от ДНКаз и РНКаз (Биолабмикс, Россия), смешивали с 1 мкл 50 мМ олиго-(dT)₂₀ праймеров (Биоссет, Россия), с последующим отжигом праймеров на матрице РНК при 70°C 5 мин в амплификаторе с последующим немедленным охлаждением в течение 2 мин на льду. Далее 12 мкл полученного образца добавляли к реакционной смеси, содержащей: 2 мкл 10× SE Buffer (SibEnzyme, Россия); 0,2 мкл M-MuLV обратной транскриптазы (200 е.а./мкл); 2 мкл 10 мМ dNTP, 3,8 мкл стерильной воды (рабочий объем 20 мкл). Реакцию проводили 1 час при 37°C и инактивировали фермент 10 минут при 70°C. В качестве контроля на загрязнение гДНК использовались образцы, которые были

синтезированы в отсутствие обратной транскриптазы (no-reverse transcription control); образцы, в которых кДНК была заменена деионизованной водой (no-template control), использовались в качестве отрицательного контроля.

2.17 Количественная ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени

Полученную в ходе обратной транскрипции кДНК разводили в 5 раз деионизованной водой. Экспрессию интересующих генов оценивали с помощью ПЦР в реальном времени с использованием BioMaster HS-qPCR SYBR Blue (2x) (BioLabMix, Россия), 500 нМ специфических праймеров (Таблица 2) и 5 мкл кДНК в системе детекции ПЦР в реальном времени CFX96 Touch™ (BioRad, Hercules, CA, США). Объем реакции составлял 25 мкл.

Таблица 2. Характеристика праймеров, использованных для анализа уровня экспрессии генов с помощью количественной ПЦР в реальном времени.

#	Функциональная группа	Ген	Название праймера	Последовательность (5' -> 3')
1	Референсный ген	<i>Tubb5</i> (tubulin, beta 5 class I)	beta TUB_F beta TUB_R	TGAAGCCACAGGTGGCAAGTAT CCAGACTGACCGAAAACGAAGT
2	Гены, вовлеченные в регуляцию	<i>Pla2g2e</i> (phospholipase A2, group IIE)	Pla2g2e_F Pla2g2e_R	GACGAGACGGATTGGTGTTG TGTCACACTCGCAGGTATGC
3	фосфо- и сфинголипидов	<i>Plcb1</i> (phospholipase C, beta 1)	Plcb1_F Plcb1_R	AGTCGCACAAGTCGTCAGAG GTATCTGCTTCCCCAGCTCC
4	Гены, вовлеченные в регуляцию	<i>Plcb4</i> (phospholipase C, beta 4)	Plcb4_F2 Plcb4_R2	GGTAGACCTCCCTTGCTTGC TAGCACTTGTCTTCCTTGCC
5	фосфо- и сфинголипидов	<i>Cers3</i> (ceramide synthase 3)	RT-Cers3-Fw RT-Cers3-Rev	TGGCGCTTTGGGAAGAAGAATG TCACGAAGACAAGCCCATCA
6	Гены, вовлеченные в регуляцию	<i>Enah</i> (enabled homolog actin regulator)	Enah_F2 Enah_R2	CACCATACAGGCAACAACACA CATGGCACTTGCGAAGACATT
7	F-актина	<i>Pfn2</i> (profilin 2)	Pfn2_F Pfn2_R	TTCCAGAGCATCACGCCAG TTGGCTCCCCACCTTGACTC
8		<i>Wasf1</i> (Wiskott-Aldrich Syndrome Protein Family Member 1)	Wasf1_F Wasf1_R	ATGTGTGTGAGCAACCTCCG TCTGGTTCATGAGGACGGTCT

Уровень экспрессии мРНК исследуемых генов был нормализован относительно уровня экспрессии гена *Tubb5* (tubulin, beta 5 class I). Обработку результатов проводили с использованием программного обеспечения «Bio-Rad CFX Manager 2.1» (Bio-Rad, США). Относительное количество продукта амплификации рассчитывали по формуле $N = 2^{-\Delta Cq}$, где N – число копий продукта амплификации, Cq (quantification cycle) – количество циклов амплификации [153].

2.18 Статистическая обработка данных

Статистическая обработка данных проводилась с использованием стандартных методов оценки достоверности различий между группами. Перед выбором критерия сравнения все наборы данных проверялись на соответствие нормальному распределению с применением критерия Колмогорова–Смирнова. Для сравнения групп с нормальным распределением использовали t-критерий Стьюдента для независимых выборок. В случаях, когда данные не соответствовали нормальному распределению, применяли непараметрический U-критерий Манна–Уитни. Для анализа изменений OCR под действием митохондриальных ингибиторов использовали тест Фридмана. Для множественных сравнений выполняли поправку Бенджамини-Хохберга. В случае PCA групповые различия были оценены с помощью PERMANOVA (пакет adonis) с 999 перестановками на евклидовой матрице расстояний нормализованных по Z-оценке интенсивностей масс-спектрометрии (среднецентрированных и масштабированных по стандартному отклонению). Различия являлись статистически достоверными при $p < 0,05$ (* либо #), $p < 0,01$ (** либо ##) и $p < 0,001$ (***) либо ###). Графическое представление результатов выполнялось в RStudio 2024.04.2 с использованием пакетов ggplot2 и ggbeeswarm.

ГЛАВА 3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

3.1 Изучение локализации белков клаудина-7, Е-кадгерина и β -катенина в клетках эпителия толстой кишки у мышей *Muc2*^{-/-}

С целью оценки распределения белков межклеточных контактов в эпителии толстой кишки при хроническом воспалении, ассоциированном с дефицитом белка муцина-2, был проведен иммуногистохимический анализ нисходящей толстой кишки мышей *Muc2*^{-/-}.

У мутантных животных было выявлено снижение уровней интенсивности флюоресценции, соответствующих белку плотных контактов (ПК) клаудину-7 и белкам адгезивных контактов (АК) β -катенину и Е-кадгерину на латеральной мембране энтероцитов по сравнению с животными дикого типа (Рисунок 5, А, Б). При этом распределение белка ZO-1 не отличалось между группами, а концентрация белка JAM-A на латеральных мембранах, напротив, была слабо повышена у животных с нокаутом гена *Muc2*.

Для выяснения возможной причины наблюдаемых изменений локализации белков был проведен Вестерн-блот анализ экстрактов крипт толстой кишки мышей с мутацией *Muc2*^{-/-}. Уровни белков β -катенина и Е-кадгерина в экстрактах не различались между группами (Рисунок 5, В). Аналогичный результат ранее был получен для двух представителей семейства клаудинов, включая белок клаудин-7, и опубликован в работе [12]. Полученные данные позволяют заключить, что нарушение локализации этих белков ПК и АК связано не со снижением синтеза или повышением деградации, а с их перераспределением из области плазматической мембраны в цитоплазму или другие клеточные структуры.

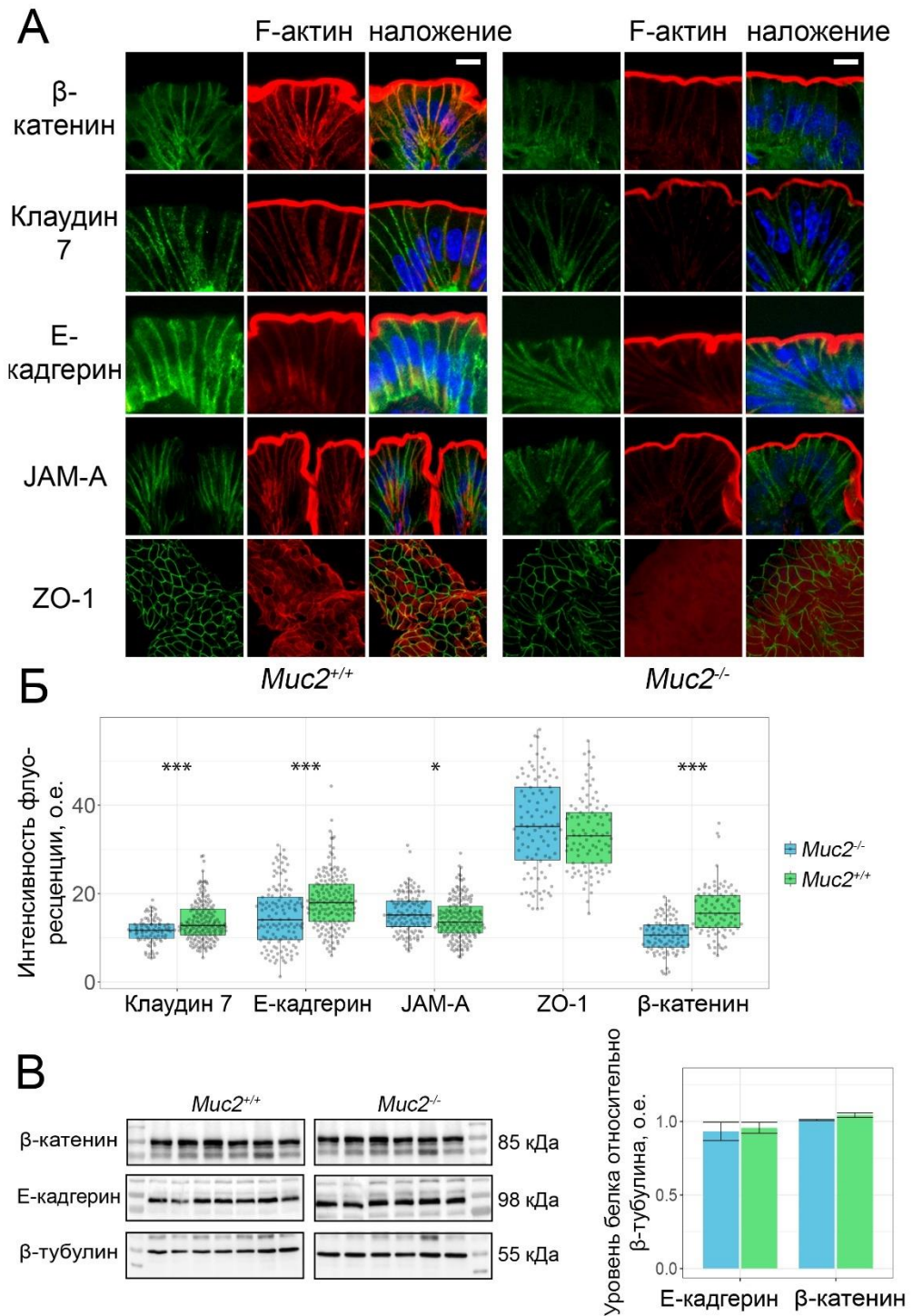


Рисунок 5. Влияние дефицита белка муцина-2 на белки межклеточных контактов в толстой кишке. (А) Иммуногистохимический анализ локализации белков плотных и адгезивных контактов в толстой кишке животных *Muc2^{-/-}*. Показаны репрезентативные изображения, полученные при анализе трех биологических реплик. Конфокальная микроскопия. Шкала – 10 мкм. (Б) Полуколичественный анализ интенсивности сигнала белков плотных и адгезивных контактов на латеральных мембранах энтероцитов животных *Muc2^{-/-}* (* – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$, U -критерий Манна–Уитни, $n = 3$). (В) Вестерн-блот-анализ содержания β-катенина (85 кДа) и Е-кадгерина (96 кДа) в криптах толстой кишки. В качестве контроля загрузки использован белок β-тубулин (55 кДа).

3.2 Характеристика локализации белка клаудина-7 в органоидах, полученных из крипт толстой кишки мышей *Muc2*^{-/-}

С целью подбора корректной модели для изучения нарушений межклеточных контактов на фоне дефицита белка муцина-2, был проведён сравнительный анализ морфологических и цитологических характеристик органоидов, полученных из крипт толстой кишки мышей линии *Muc2*^{-/-} и их однопомётников дикого типа (Рисунок 6).

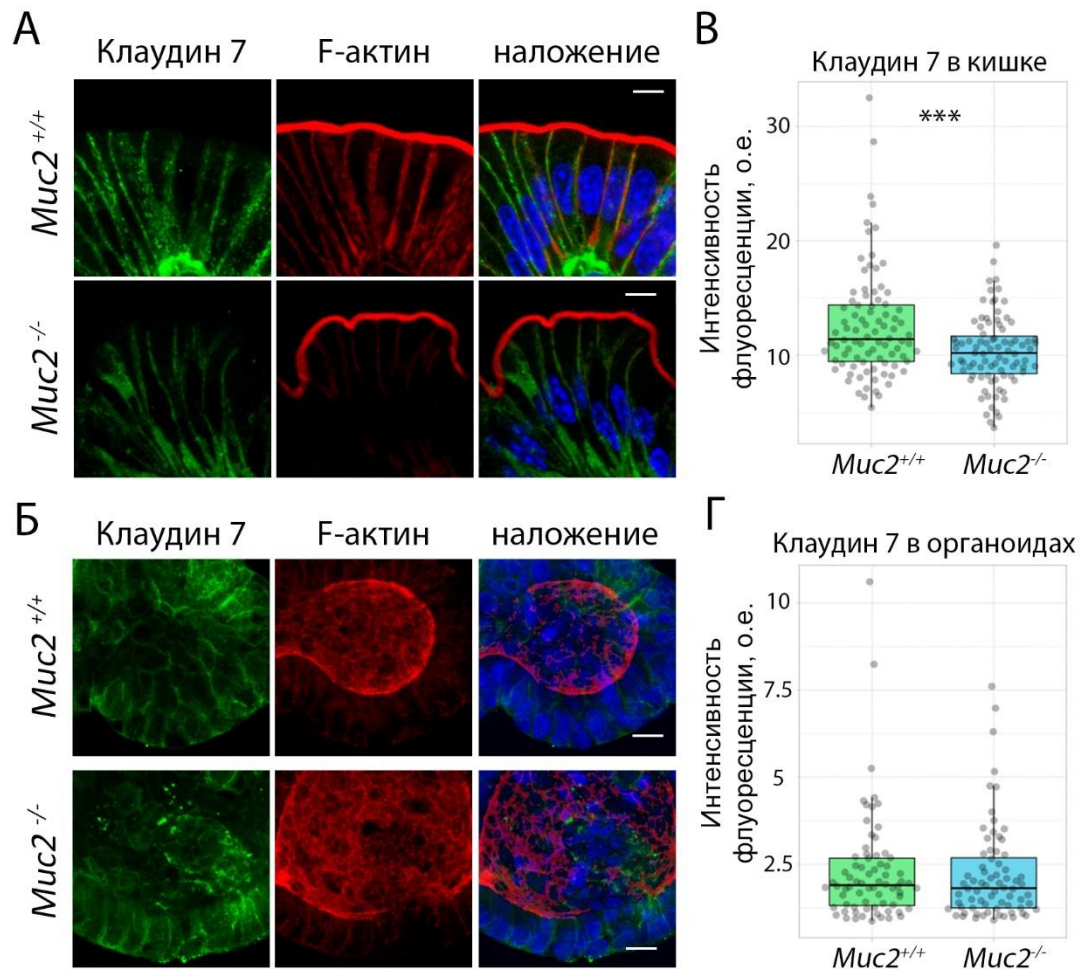


Рисунок 6. Сравнительный анализ локализации белка клаудина-7 в ткани толстой кишки (А) и органоидах (Б) животных *Muc2*^{+/+} и *Muc2*^{-/-}. (А, В) Иммуногистохимический анализ локализации белков F-актина (красным) и клаудина-7 (зеленым) в толстой кишке и органоидах, полученных от животных дикого типа и от мутантов *Muc2*^{-/-}. ДНК-специфическим красителем DAPI выявляли ядра (синим). Конфокальная микроскопия. Шкала – 10 мкм. (В, Г) Полуколичественный анализ интенсивности сигнала белка клаудина-7 в кишке показал достоверное его снижение в кишке мутантных животных (*** – $p < 0,001$, U-критерий Манна–Уитни, $n = 3$).

Органоиды, полученные от животных *Muc2*^{-/-}, сохраняют тенденцию к увеличенной пролиферации эпителия и растут значительно быстрее. Для оценки сохранности фенотипа,

описанного ранее *in vivo*, была проведена иммуногистохимическая оценка локализации белка клаудин-7 в органоидах, окрашенных с использованием специфических антител. Полученные полуколичественные данные интенсивности флуоресценции сравнивались с результатами, ранее полученными на гистологических срезах кишки. Анализ показал, что в условиях трёхмерной культуры кишечные органоиды, полученные от животных линии *Muc2^{-/-}*, не воспроизводят нарушение субклеточной локализации клаудина-7, наблюдаемое *in vivo* (Рисунок 6). Следовательно, органоиды не подходят для изучения нарушений эпителиального барьера, характерных для исходной ткани мышей с мутацией *Muc2^{-/-}*.

3.3 Изучение структурной целостности крипт толстой кишки при кратковременном культивировании *ex vivo*

В связи с тем, что кишечные органоиды, полученные от мышей с нокаутом гена *Muc2*, не воспроизводят характерных нарушений субклеточной локализации белков межклеточных контактов, для дальнейшего изучения была рассмотрена альтернативная модель – крипты, выделенные из толстой кишки и культивируемые *ex vivo*.

Описанные ранее эксперименты по оценке митохондриального дыхания показали, что крипты сохраняют высокую жизнеспособность в течение не менее трёх часов при культивировании на матриксе [145]. Основываясь на этих данных, в настоящем исследовании проведена оценка изменений структуры F-актина и локализации белков ПК в течение первых часов инкубирования крипт после изоляции.

Крипты культивировали в среде Intesticult на плёнке из матрикса Cultrex. Иммуногистохимический анализ показал, что уже через 1 час инкубации начинается утрата типичной морфологии: клетки теряют апикально-базальную полярность, нарушается организация актинового цитоскелета (Рисунок 7, А). Через 2-3 часа культивирования происходит перераспределение локализации белка клаудина-7, и нарушение микрофиламентов становится более выраженным. Оценка жизнеспособности крипт с использованием красителя DAPI выявила, что на 3 час культивирования фрагменты крипт целиком состоят из клеток, проницаемых для этого красителя, что свидетельствует о нарушении целостности плазматической мембраны и клеточной гибели (Рисунок 7, Б). Полученные данные свидетельствуют о том, что изолированные крипты не являются адекватной моделью для изучения свойств эпителиального барьера.

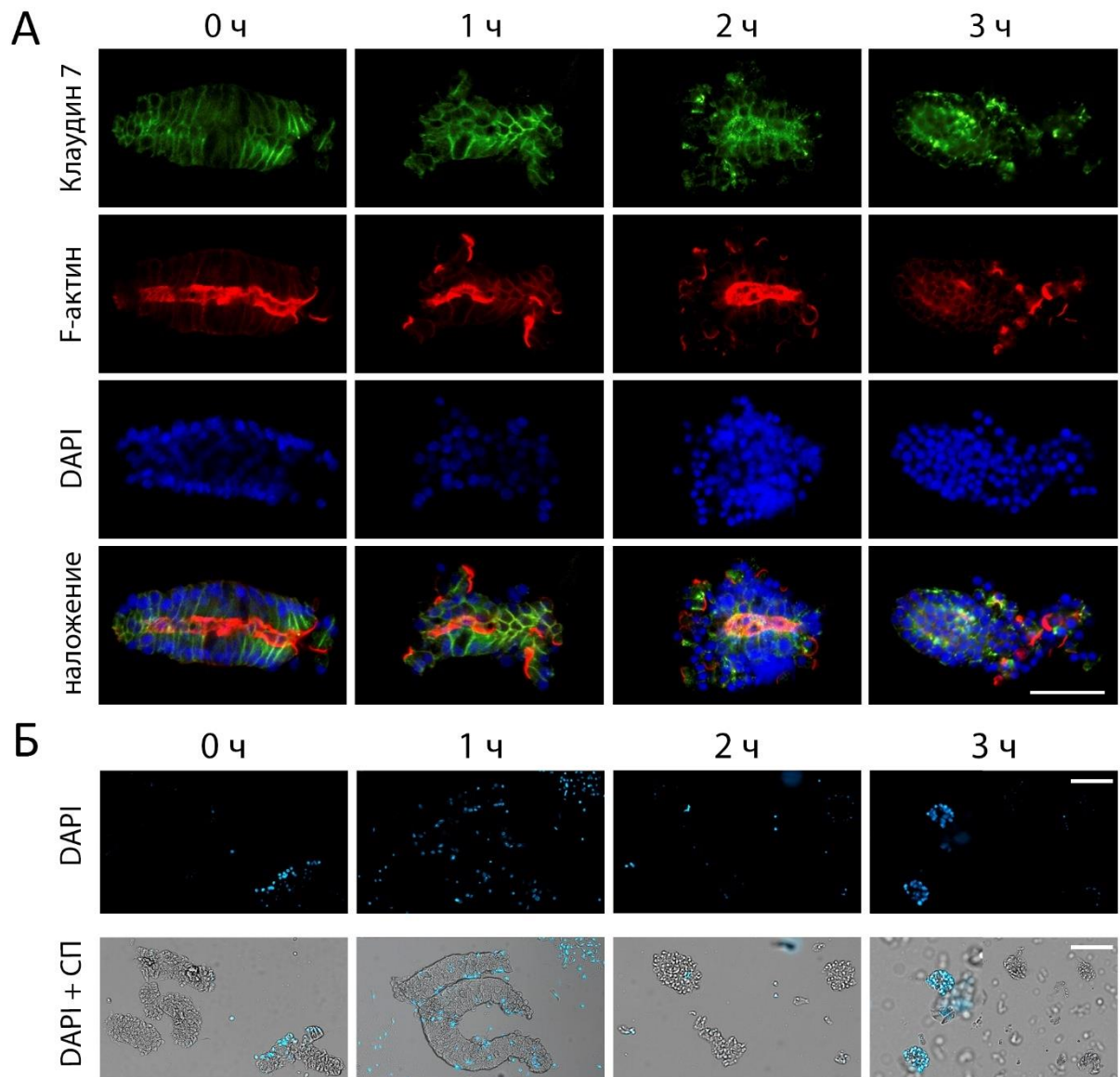


Рисунок 7. Экспланты толстой кишки мышей дикого типа после культивирования. (А) Иммуногистохимический анализ локализации белков F-актина (красным) и клаудина-7 (зеленым) в криптах, выделенных из ткани толстой кишки животных дикого типа. ДНК-специфическим красителем DAPI выявляли ядра (синим). В криптах, культивируемых в течение 3 часов на мембране из матрикса, постепенно теряется поляризация энтероцитов. Конфокальная микроскопия. Шкала – 50 мкм. (Б) После 3 часов культивирования жизнеспособность крипт снижается, о чём свидетельствует проникновение красителя DAPI в ядра крипт (синим). СП – светлопольная микроскопия. Шкала – 100 мкм.

3.4 Оценка морфологии клеток эпителия в эксплантах толстой кишки в процессе культивирования *ex vivo*

В качестве альтернативы крипт для изучения межклеточных контактов была рассмотрена *ex vivo* модель эксплантов толстой кишки. Культивирование эксплантов

проводилось по наиболее методологически простому протоколу (раздел «Материалы и методы») и позволило оценить временные рамки сохранения морфологии эпителия и локализации белков межклеточных контактов.

Морфологическая оценка фиксированных образцов показала, что в течение первых 18 часов культивирования структура эпителиального слоя остаётся стабильной: сохраняется апикально-базальная полярность клеток, а также характерная субклеточная локализация F-актина и белка клаудина-7 (Рисунок 8, А). После 24 часов инкубации отмечается частичная деградация ткани: лишь в отдельных фрагментах сохраняется интактная морфология. К 30-ти часам наблюдается полная утрата специфической локализации как F-актина, так и клаудина-7, что свидетельствует о нарушении целостности межклеточных структур, составляющих основу барьера кишечника (Рисунок 8, А).

Анализ жизнеспособности ткани показал, что на ранних временных точках (1-18 ч) большинство клеток эпителия остаются непроницаемыми для красителя ДНК DAPI, в отличие от образца, обработанного этанолом, который использовался в качестве положительного контроля клеточной гибели (Рисунок 8, Б). При этом морфология ядер в фиксированных препаратах сохраняется нормальной, признаки фрагментации отсутствуют. Таким образом, *ex vivo* модель эксплантов толстой кишки животных дикого типа позволяет сохранить морфологические и цитологические характеристики эпителия в течение первых 12–18 часов культивирования.

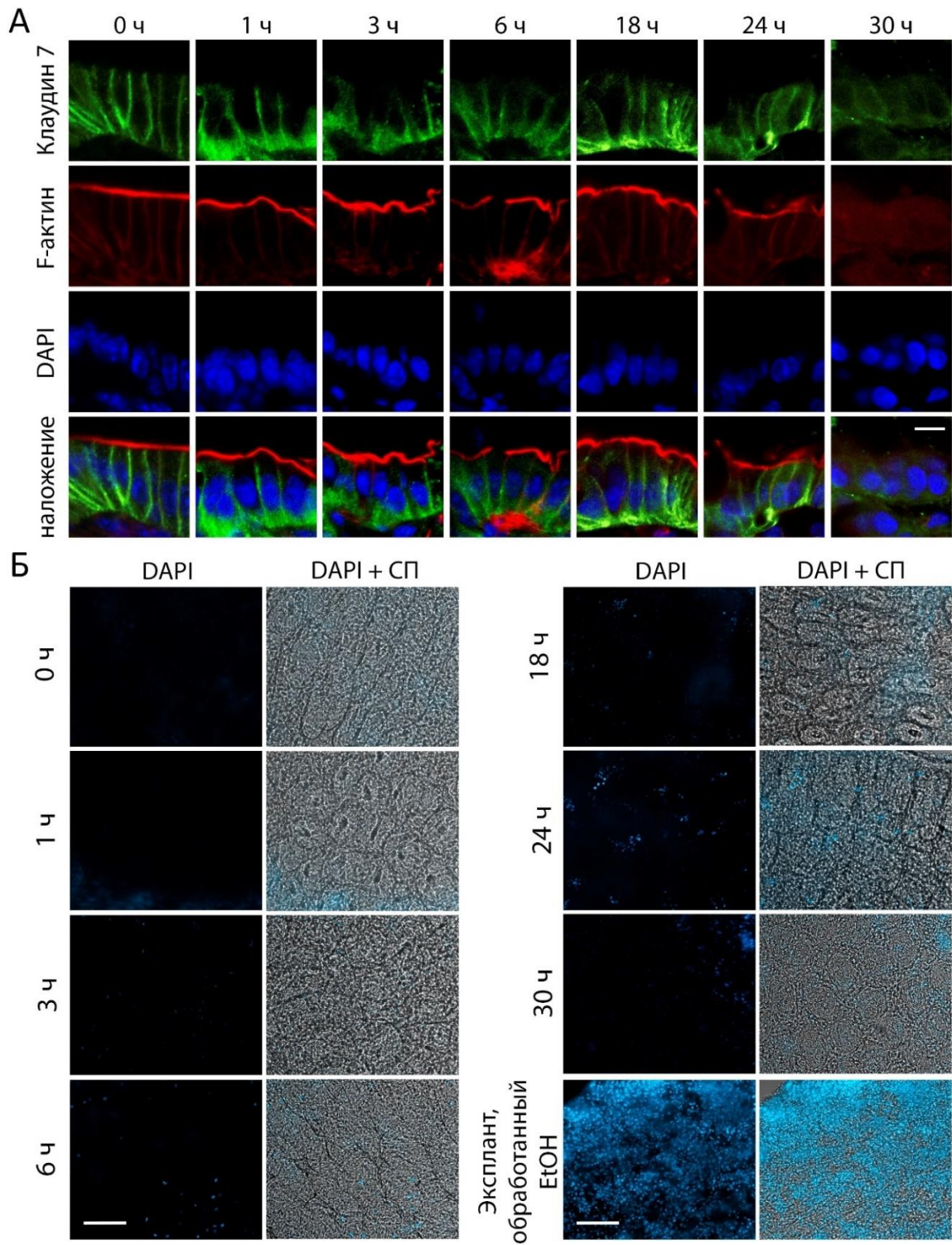


Рисунок 8. Экспланты толстой кишки мышей дикого типа после культивирования. (А) Иммуногистохимический анализ локализации белков F-актина (красным) и клаудина-7 (зеленым) в эксплантах толстой кишки, полученных от животных дикого типа. ДНК-специфическим красителем DAPI выявляли ядра (синим). У эксплантов наблюдается полная делокализация клаудина-7 из области плотных контактов и разрушение актиновых филаментов через 30 часов культивации. Конфокальная микроскопия. Шкала – 10 мкм. (Б) Репрезентативное фото культивируемых эксплантов, мёртвые клетки окрашены DAPI (синим). СП – светлопольная микроскопия. Шкала – 100 мкм.

3.5 Влияние дестабилизации F-актина на структуру и функцию плотных и адгезивных контактов у мышей дикого типа

С целью оценки зависимости структуры и функции межклеточных контактов от состояния актинового цитоскелета в условиях, приближённых к физиологическим, были проведены *in vivo* эксперименты с использованием фармакологических агентов, воздействующих на динамику F-актина.

Животным линии C57BL/6 ректально вводили латрункулин А – ингибитор полимеризации актина, и джасплакинолид – стабилизатор полимерного актина. Через 3 часа после введения кишечник извлекали и проводили иммуногистохимический анализ срезов. Количественная оценка интенсивности флуоресценции показала, что оба препарата вызывали достоверные нарушения структуры актинового цитоскелета как в апикальной, так и в латеральной частях энтероцитов (Рисунок 9, А-Е, актин).

Нарушение структуры F-актина сопровождалось изменением локализации белков межклеточных контактов. В частности, воздействие латрункулина А приводило к повышению концентрации белков клаудина-7 и β -катенина на латеральных мембранах (Рисунок 9, В), несмотря на деполимеризацию микрофиламентов. В то же время джасплакинолид ухудшал структуру микрофиламентов, что сопровождалось делокализацией белков клаудина-7 и β -катенина (Рисунок 9, Е). Таким образом, показано, что смещение баланса между мономерной и полимерной формами актина нарушает пространственную организацию белков плотных и адгезивных контактов.

Органоиды, полученные из ткани животных дикого типа, широко используются для исследования функциональности кишечного барьера при воздействии тестируемых веществ [154]. Для проверки функциональных последствий структурных нарушений F-актина был проведён тест на проницаемость органоидов, полученных из крипт толстой кишки мышей дикого типа. В нормальных условиях 4 кДа FITC-декстран не проникает в полость органоидов. Однако после обработки латрункулином А наблюдалось накопление флуоресцентного маркера в просвете органоидов (Рисунок 9, Ж, З), что свидетельствует о нарушении барьерной функции. Таким образом, полученные данные демонстрируют, что нарушения актинового цитоскелета – независимо от направления смещения его динамического равновесия – сопровождаются изменением локализации белков межклеточных контактов и повышением проницаемости эпителия. Эти наблюдения подтверждают критическую роль F-актина в поддержании структурной и барьерной целостности кишечного эпителия.

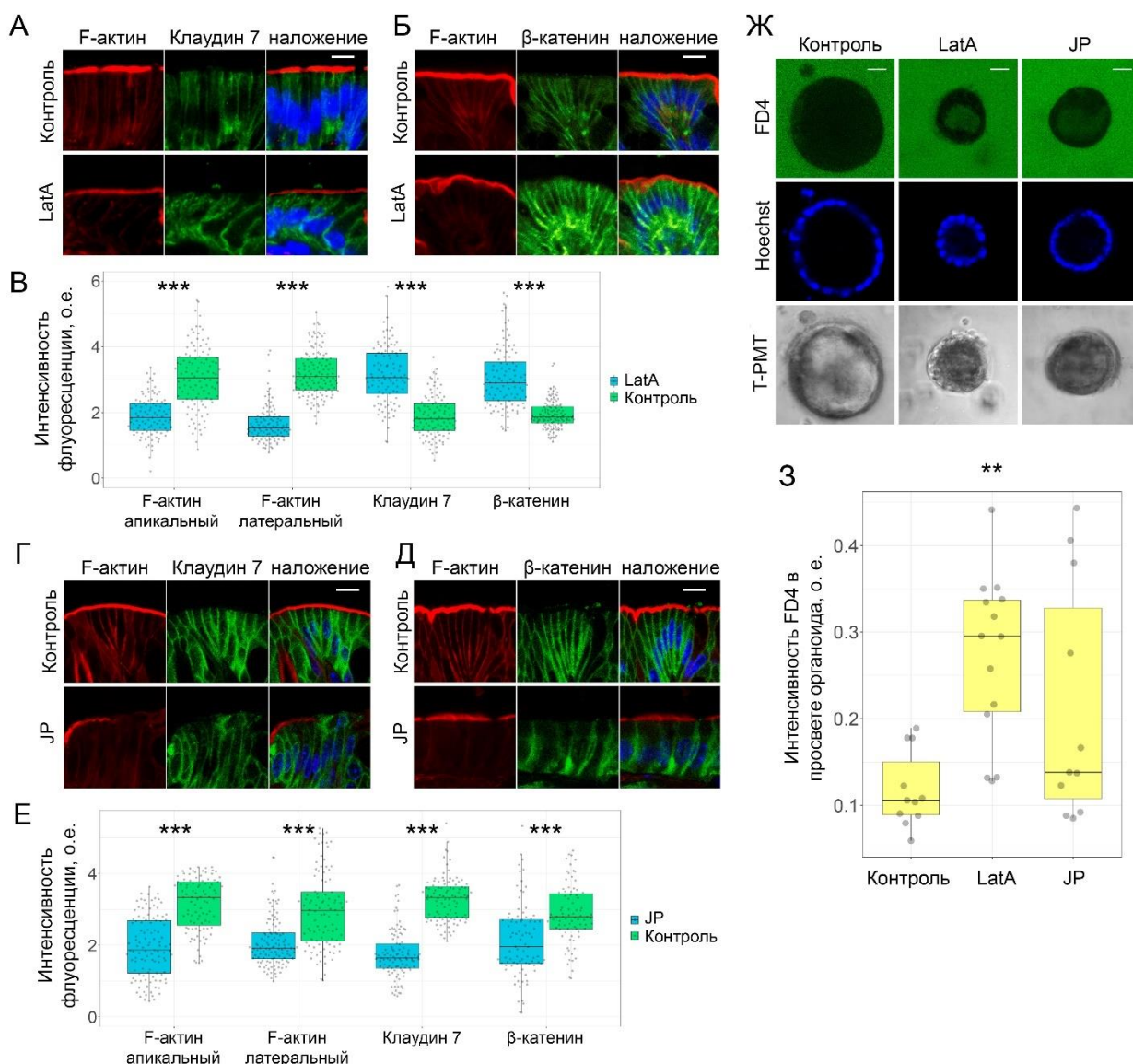


Рисунок 9. Воздействие модуляторов сборки белка F-актина на локализацию и функцию белков межклеточных контактов. (А, Б) Иммуногистохимический анализ локализации F-актина (красным) белков клаудин-7 и β-катенин (зелёным) в толстой кишке животных дикого типа после ректального введения латрункулина А (LatA). ДНК-специфическим красителем DAPI выявляли ядра (синим). Конфокальная микроскопия. Шкала – 10 мкм. (В) Полуколичественный анализ интенсивности флуоресценции после ректального введения латрункулина А (***) – $p < 0,001$, U -критерий Манна–Уитни). (Г, Д) Иммуногистохимический анализ локализации F-актина (красным) белков клаудин-7 и β-катенин (зелёным) в толстой кишке животных дикого типа после ректального введения джасплакинолида (JP). ДНК-специфическим красителем DAPI выявляли ядра (синим). Конфокальная микроскопия. Шкала – 10 мкм. (Е) Полуколичественный анализ интенсивности флуоресценции после ректального введения джасплакинолида (***) – $p < 0,001$, U -критерий Манна–Уитни). (Ж) Функциональный тест на проницаемость органоидов при добавлении модуляторов полимеризации актина в среду. Т-РМТ – режим проходящего света. Конфокальная микроскопия. Шкала – 50 мкм. (Н) Анализ относительной интенсивности флуоресценции 4 кДа FITC-

декстрана (FD4) внутри органоидов при добавлении модуляторов актина (** – $p < 0,01$, U -критерий Манна–Уитни с поправкой Бонферрони). ДНК-специфическим красителем Hoechst 33342 выявляли ядра (синим).

3.6 Анализ организации F-актина и межклеточных контактов в эпителии толстой кишки на модели хронического колита, индуцированного DSS

Для проверки воспроизводимости полученных ранее наблюдений была использована химически индуцированная модель колита, основанная на циклическом употреблении натриевой соли сульфата декстрана (dextran sulfate sodium, DSS).

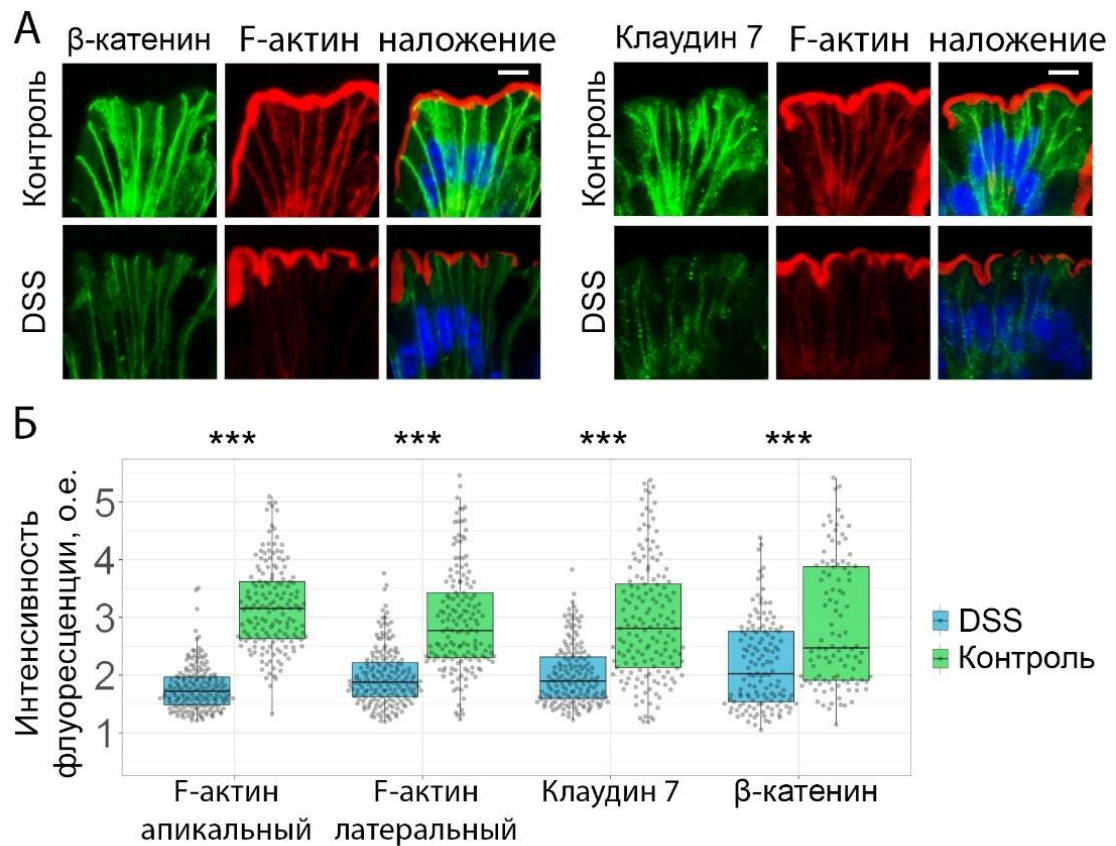


Рисунок 10. Влияние хронического воспаления, вызванного DSS, на белки межклеточных контактов в толстой кишке. (А) Иммуногистохимический анализ локализации F-актина (красным) белков клаудин-7 и β-катенин (зелёным) в толстой кишке животных с хроническим DSS-индуцированным колитом. ДНК-специфическим красителем DAPI выявляли ядра (синим). Конфокальная микроскопия. Шкала – 10 мкм. (Б) Полуколичественный анализ интенсивности флуоресценции белков F-актина, клаудина-7 и β-катенина (***) – $p < 0,001$, U -критерий Манна–Уитни).

Иммуногистохимический анализ эпителия нисходящей кишки мышей с DSS-индуцированным воспалением показал, что структура F-актина в клетках эпителия нарушена сходно с моделью *Muc2^{-/-}* (рис. 10, А, Б). Воспроизвелось и перераспределение белков межклеточных контактов: клаудин-7 и β-катенин имеют сниженный уровень

локализации на латеральных мембранах (Рисунок 10, А, Б). Полученные данные демонстрируют, что нарушение архитектуры микрофиламентов, а также перераспределение белков межклеточных контактов являются общими признаками для как минимум двух моделей хронического воспаления кишечника. Эти признаки потенциально могут рассматриваться в качестве универсальных морфологических характеристик хронического колита у лабораторных животных.

3.7 Исследование метаболических нарушений и изменение экспрессии генов, участвующих в регуляции липидного метаболизма и перестройке F-актина у мышей *Muc2*^{-/-}

С целью выявления метаболических процессов, затронутых на фоне нарушения целостности кишечного барьера в генетической модели колита с нокаутом гена *Muc2*, были получены метаболомные профили крипт, выделенных из толстой нисходящей кишки мышей линий *Muc2*^{+/+} и *Muc2*^{-/-}.

Для оценки общей вариации метаболомных профилей между группами *Muc2*^{+/+} и *Muc2*^{-/-} использовали анализ главных компонент (Рисунок 11, А). Первая главная компонента (PC1) объясняет 56,1% общей дисперсии, вторая (PC2) – ещё 19,8%, суммарно охватывая 75,9% вариации в выборке. Группы формируют отчетливо разделяющиеся кластеры с небольшой зоной перекрытия 95% доверительных интервалов, пермутационный многомерный дисперсионный анализ (PERMANOVA) выявил статистически значимую разницу между группами «*Muc2*^{+/+}» и «*Muc2*^{-/-}» ($F = 4,04$, $R^2 = 0,336$, $p = 0,008$, 999 перестановок), что указывает на то, что приблизительно 33,6% дисперсии в профилях масс-спектрометрии можно отнести к разнице генотипов (Рисунок 11, А).

Функциональный анализ обогащения метаболических путей показал достоверное обогащение путями, связанных с метаболизмом фосфо- и сфинголипидов, в том числе биосинтез жирных кислот, глицерофосфолипидов и церамидов (Рисунок 11, Б, В). Эпителий животных с дефицитом белка муцина-2 продемонстрировал накопление фосфолипидов, таких как фосфатидилхолин, -серин, -этаноламин, -инозитол, -глицерин и сфинголипидов, в частности церамидов (Рисунок 11, Б, Г). Эти изменения могут указывать на нарушенный липидный обмен, ассоциированный с слабым хроническим воспалением и повреждением эпителиального барьера.

Для выявления механизмов, потенциально лежащих в основе выявленных метаболических нарушений, дополнительно был проведён анализ экспрессии генов, участвующих в регуляции липидного обмена и организации актинового цитоскелета,

методом количественной ПЦР в реальном времени (Рисунок 11, Д). Оценка относительного уровня транскриптов показала снижение экспрессии генов *Enah*, *Pfn2* и *Wasf1*, продукты которых участвуют в полимеризации и ветвлении F-актина. Также было выявлено повышение уровня экспрессии генов *CerS3* (церамидсинтаза 3) и *Pla2g2e* (фосфолипаза А), а также снижение экспрессии *Plcb1*, *Plcb4* (фосфолипазы В). Эти изменения транскриптомного профиля хорошо согласуются с результатами метаболомного анализа и ранее показанным нарушением структуры актинового цитоскелета, выявленным с помощью иммуногистохимии.

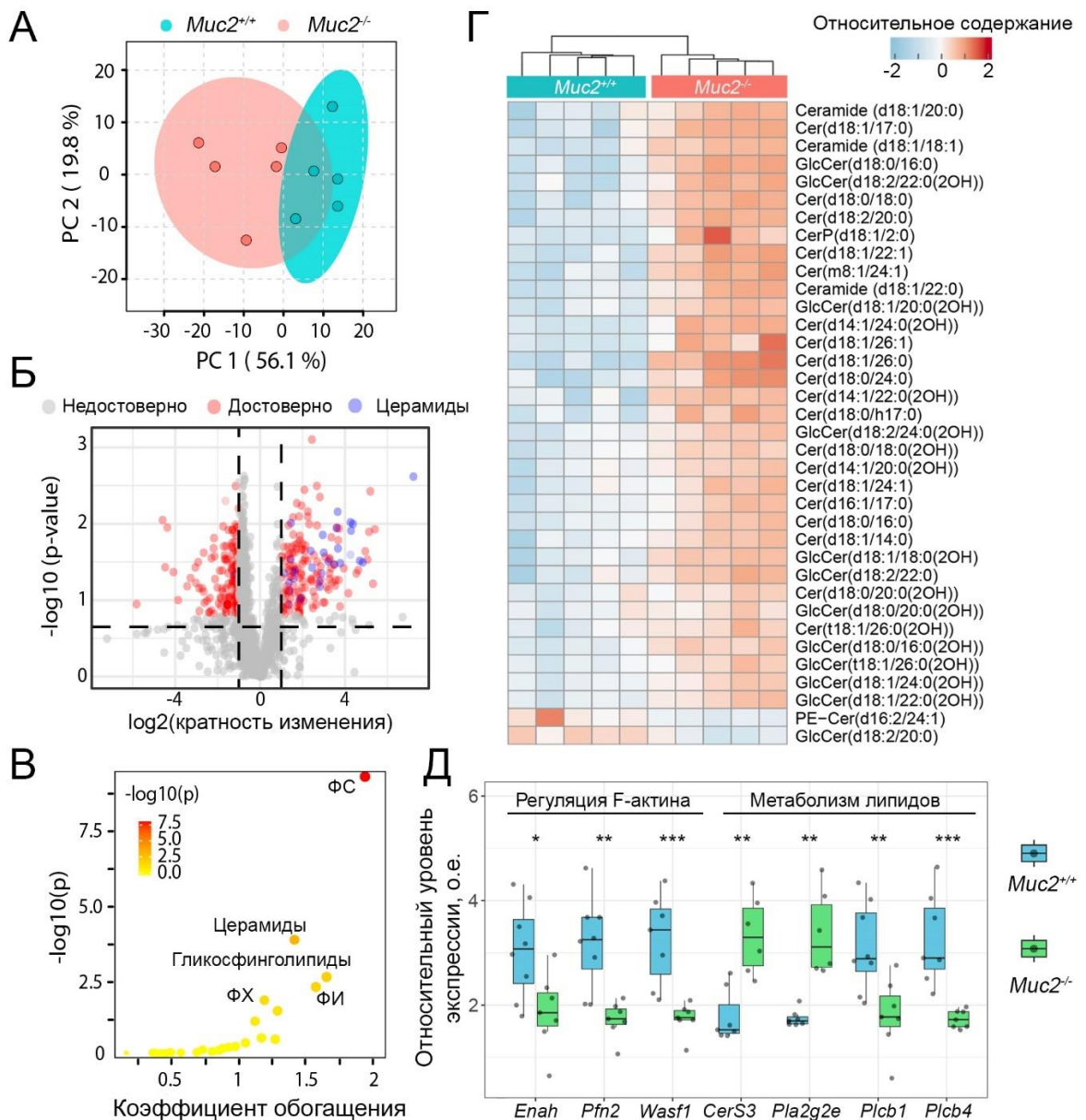


Рисунок 11. Исследование метаболических нарушений и экспрессии генов, участвующих в регуляции липидного метаболизма и перестройке F-актина, в криптах мышей *Muc2*^{+/+} и *Muc2*^{-/-}. (А) Анализ главных компонент метаболических профилей эпителия толстой кишки мышей линий *Muc2*^{+/+} и *Muc2*^{-/-}. Овальные области отражают 95% доверительные интервалы с центром в точке средних значений PC1 и PC2, различия

статистически подтверждены тестом PERMANOVA ($F = 4,0394$, $R^2 = 0,33551$, $p\text{-value} = 0,008$ было получено с использованием 999 перестановок). (Б) График дифференциальной экспрессии (Volcano-plot), демонстрирующий достоверное увеличение церамидов в крипах животных *Muc2*^{-/-}. (В) Диаграмма обогащения метаболических путей у животных *Muc2*^{-/-}. (Г) Тепловая карта относительного содержания (relative abundance) различных церамидов в крипах животных *Muc2*^{-/-}. (Д) Количественный анализ экспрессии генов, вовлечённых в метаболизм липидов и регуляцию полимеризации микрофиламентов (* – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$, U -критерий Манна–Уитни).

3.8 Изучение эффекта длительного воздействия экзогенных фосфолипидов на ультраструктуру эпителия толстой кишки

С учётом ранее полученных данных о повышенном содержании липидов в тканях толстой кишки у животных с нокаутом гена *Muc2*, в настоящей работе были экспериментально смоделированы условия хронического воздействия избытка экзогенных фосфолипидов на эпителий кишечника животных дикого типа. Целью данного эксперимента являлась оценка морфологических изменений клеток эпителия толстой кишки при длительном потреблении фосфолипидов.

Анализ ультраструктуры клеток кишечного эпителия проводился методом просвечивающей электронной микроскопии (Рисунок 12). У обеих групп было зафиксировано наличие липидных включений в просвете крист митохондрий (Рисунок 12, А-Г). У животных, получавших корм с избытком фосфолипидов, в энтероцитах нисходящей толстой кишки были обнаружены выраженные изменения ультраструктуры митохондрий. Анализ морфометрии показал статистически значимое снижение плотности крист на единицу площади митохондриального матрикса (Рисунок 12, Ж).

Количественная оценка содержания липидных капель в просвете митохондрий показала достоверное увеличение в опытной группе числа митохондрий со включениями. Также было подтверждено увеличение среднего диаметра включений в митохондриях клеток животных с диетой, богатой фосфолипидами, по сравнению с контролем (Рисунок 12, Ж). При этом ширина просветов плотных и адгезивных контактов эпителиальных клеток не имеют достоверных отличий (Рисунок 12Д, Е). Данные, полученные в этом эксперименте, опубликованы в [146].

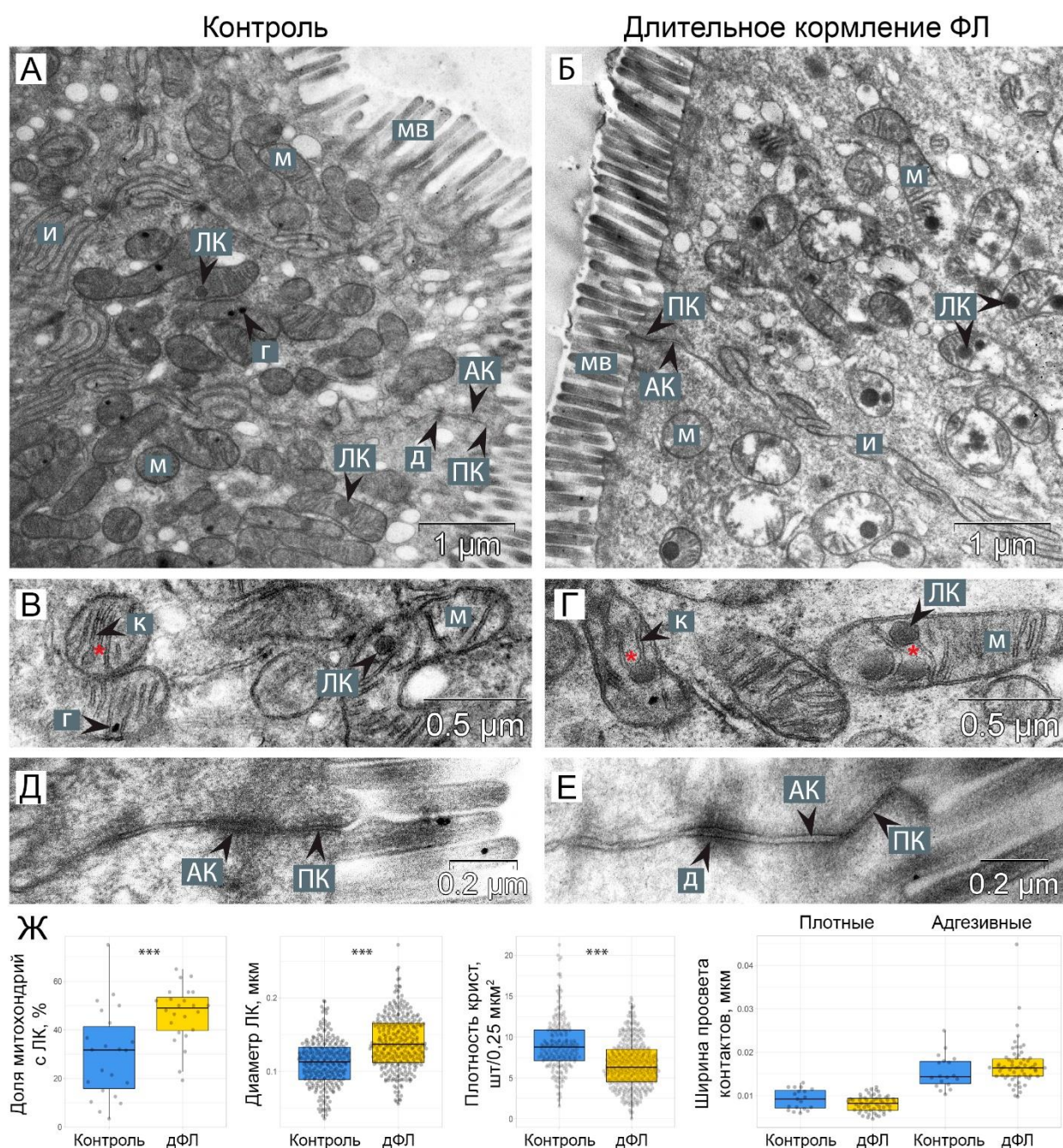


Рисунок 12. Ультраструктурные особенности клеток эпителия толстой кишки на фоне длительной диеты, богатой фосфолипидами (дФЛ). (А-Е) Энтероциты нисходящей толстой кишки мышей дикого типа на продолжительной диете, богатой фосфолипидами. (А, В, Д) контроль, (Б, Г, Е) мыши на дФЛ. Расширенные кристы отмечены красными звездами. АК: адгезивный контакт; К: кристы; Д: десмосома; Г: гранула кальция; И: интердигитации; ЛК: липидная капля; М: митохондрия; МВ: микроворсинки; ПК: плотный контакт. Просвечивающая электронная микроскопия. (Ж) Морфометрический анализ митохондрий, липидных капель, адгезивных и плотных контактов ($n = 2$, *** – $p < 0,001$, t-критерий Стьюдента). [146]

3.9 Оценка влияния краткосрочного воздействия экзогенных фосфолипидов на ультраструктуру, митохондриальное дыхание и проницаемость кишечного барьера *in vivo*

Так как длительное потребление фосфолипидов приводило к нарушениям митохондриальной ультраструктуры в эпителии толстой кишки, в настоящем исследовании была поставлена задача оценить, сопровождается ли аналогичными изменениями краткосрочное поступление фосфолипидов с пищей и какое влияние они оказывают на эпителиальный барьер.

Для этого был проведён отдельный эксперимент, в котором мыши в возрасте 8 недель получали корм, обогащённый фосфолипидами в течение двух недель. Изучение ультраструктуры показало, что даже двухнедельное употребление фосфолипидов вызывает выраженные изменения внутренней организации митохондрий в клетках кишечного эпителия (Рисунок 13, А-Г). Морфометрический анализ подтвердил снижение количества крист, увеличение содержания липидных капель и их среднего диаметра (Рисунок 13, Д). Данные, полученные в этом эксперименте, опубликованы автором выпускной научно-квалификационной работы в [146].

Для оценки функционального состояния митохондрий было проведено измерение митохондриального дыхания в крипах толстой кишки животных после двухнедельного приёма фосфолипидов с использованием технологии Agilent Seahorse (Рисунок 14). Базальная скорость потребления кислорода (oxygen consumption rate, OCR) не отличалась между группами, однако резервная дыхательная ёмкость, активируемая после стимуляции переносчиком протонов FCCP, была достоверно снижена у животных, употреблявших фосфолипиды (Рисунок 14, А, Б). Отсутствие повышения OCR после воздействия FCCP свидетельствует о снижении чувствительности митохондрий к нарушению протонного градиента. Проверка жизнеспособности крипов после инкубации с олигомицином и FCCP показала, что эти вещества не оказывают токсического воздействия на клетки при использовании в экспериментальных концентрациях (Рисунок 14, В). В совокупности эти данные указывают на снижение функционального резерва митохондрий в условиях избыточного поступления экзогенных фосфолипидов, что может быть связано с нарушением работы компонентов дыхательной цепи, в частности комплекса IV.

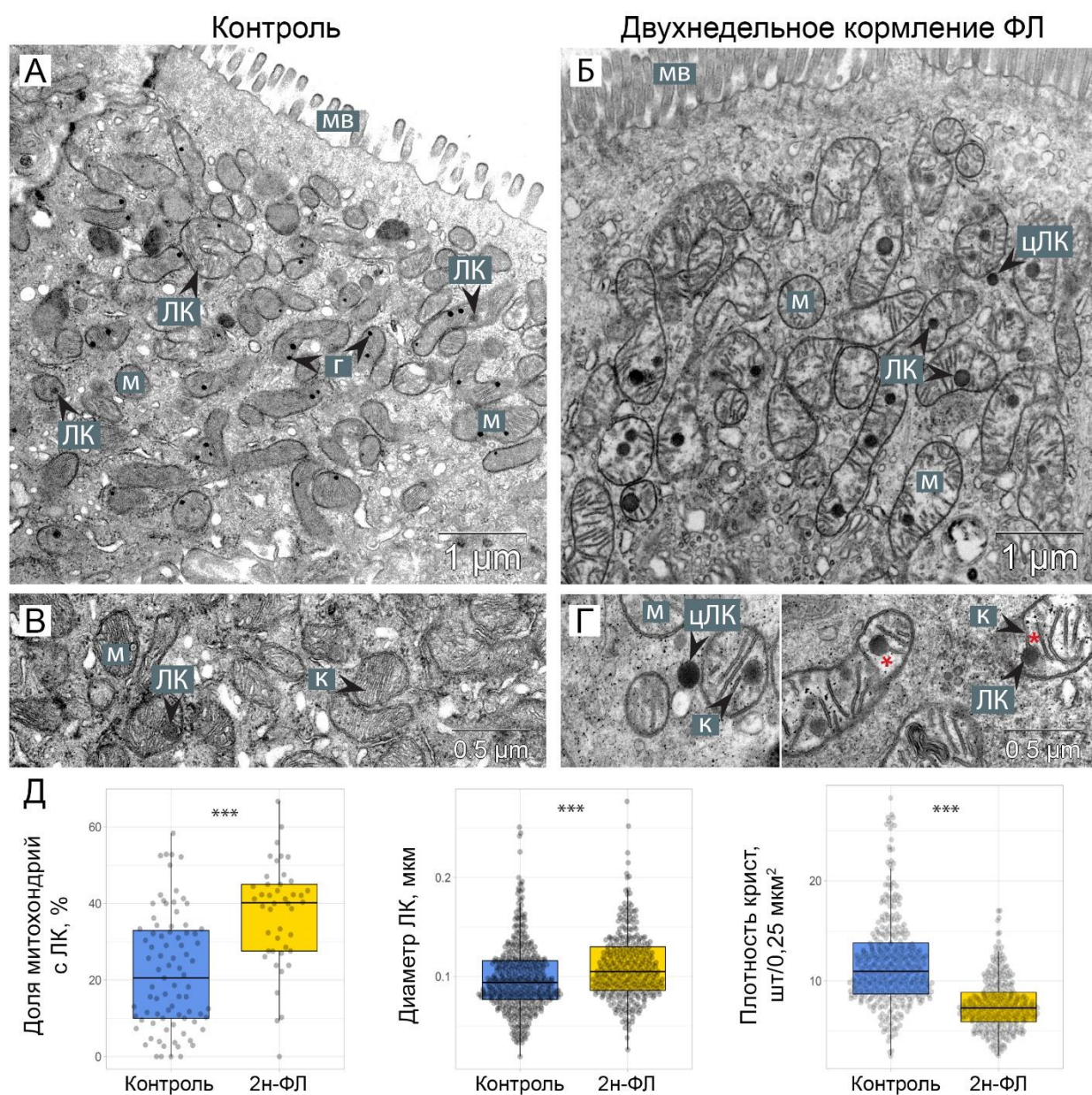


Рисунок 13. Ультраструктурные особенности клеток эпителия толстой кишки на фоне двухнедельной диеты, богатой фосфолипидами (2н-ФЛ). (А-Г) Нисходящая толстая кишка мышей после двухнедельной диеты, богатой фосфолипидами. (А, В) контроль. (Б, Г) мыши из группы 2н-ФЛ. Расширенные кристы отмечены красными звездами. К: кристы; Г: гранула матрикса; ЛК: липидная капля; цЛК: цитоплазматическая липидная капля; М: митохондрия; МВ: микроворсинки. Просвечивающая электронная микроскопия. (Д) Морфометрический анализ митохондрий ($n = 2$, *** – $p < 0,001$, t-критерий Стьюдента). Данные, полученные автором диссертационной работы, опубликованы в [146]

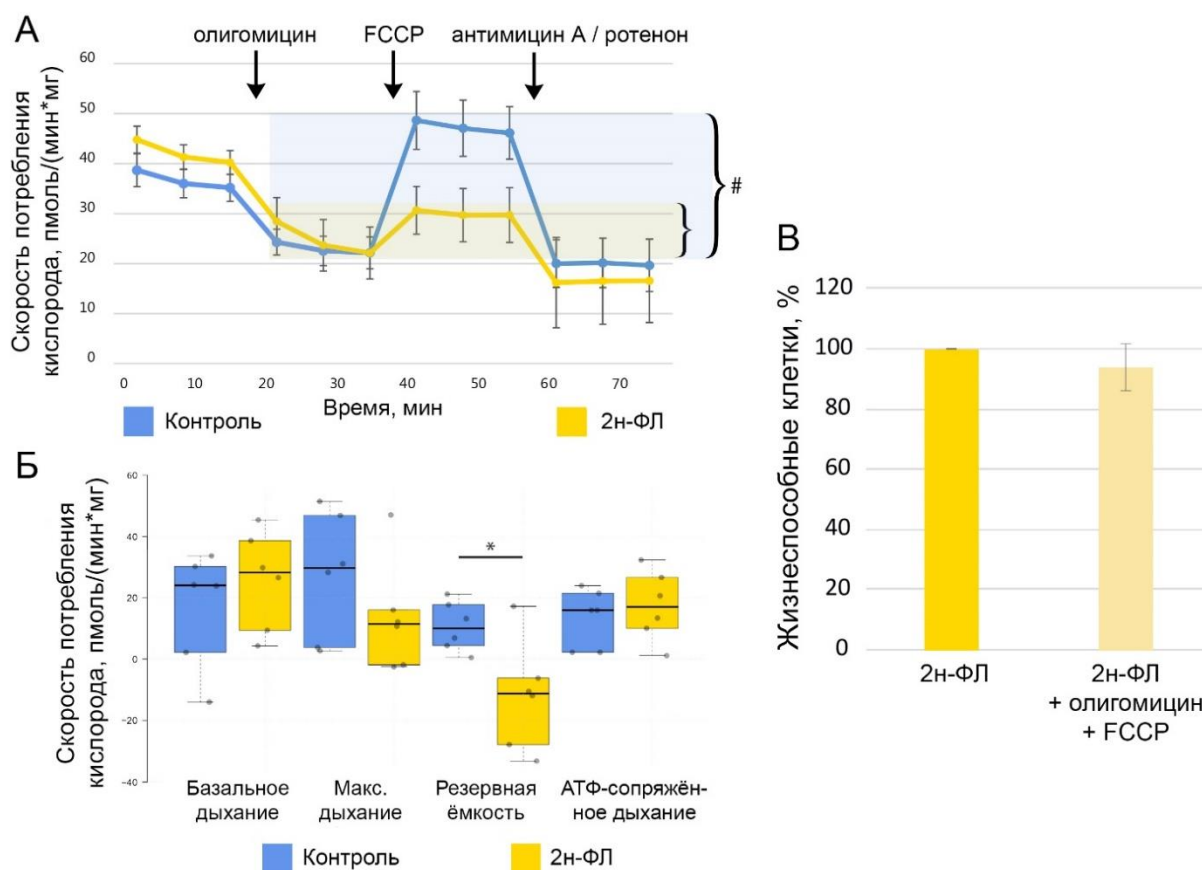


Рисунок 14. Влияние экзогенно-поступающих фосфолипидов на дыхательную способность митохондрий эпителия толстой кишки. (А) Скорость потребления кислорода, измеренная с помощью анализатора Seahorse XF24 в процессе выполнения протокола Mito Stress Test ($n = 6$, # – $p < 0,05$, критерий Фридмана). (Б) Функциональные параметры дыхания митохондрий, оцененные с помощью анализатора Seahorse XF24 ($n = 6$, * – $p < 0,05$, U -критерий Манна-Уитни). (В) Жизнеспособность эпителиальных клеток толстой кишки после добавления ингибиторов олигомицина и FCCP. 2н-ФЛ – двухнедельная диета, богатая фосфолипидами. Данные, полученные автором диссертационной работы, опубликованы в. [146]

В дополнение к оценке состояния митохондрий была проанализирована структура межклеточных контактов. Визуальная оценка по данным электронной микроскопии не выявила различий в морфологии плотных и адгезивных контактов между контрольной группой и группой с краткосрочным приёмом фосфолипидов (Рисунок 15, А). Тем не менее, количественный морфометрический анализ показал слабо достоверные различия в толщине ПК и АК (Рисунок 15, Б). Иммуногистохимическое окрашивание на белок клаудин-7 показало снижение интенсивности его локализации на апикальной трети латеральной мембраны эпителиальных клеток у животных, получавших корм, обогащённый фосфолипидами (Рисунок 15, В, Г). Несмотря на эти изменения, функциональная оценка барьерной проницаемости кишки методом перорального введения 4 кДа FITC-декстрана не выявила различий между группами (Рисунок 15, Д). Таким образом, обнаруженные

структурные изменения, хотя и обладают статистической значимостью, но не сопровождаются нарушением барьерной функции на уровне целого органа.

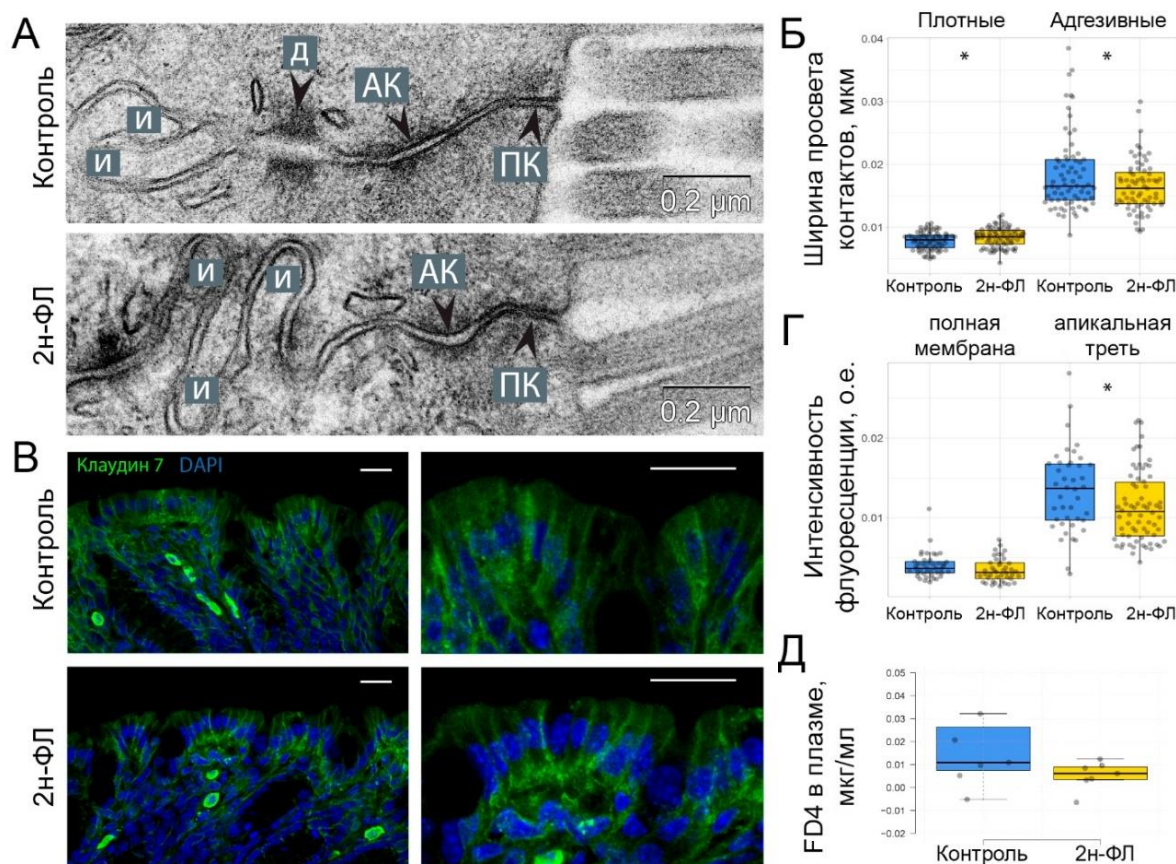


Рисунок 15. Влияние двухнедельной диеты, богатой фосфолипидами (2н-ФЛ) на эпителиальный барьер толстой кишки. (А) Апиальные контакты между клетками. АК: адгезивный контакт; Д: десмосома; И: интердигитации; ПК: плотный контакт. (Б) Морфометрический анализ ширины плотных и адгезивных контактов ($n = 2$, * – $p < 0,05$, t-критерий Стьюдента). Просвечивающая электронная микроскопия. (В) Иммуногистохимический анализ белка клаудина-7 в нисходящем отделе толстой кишки контрольных мышей и мышей 2н-ФЛ. Конфокальная микроскопия. Шкала – 15 мкм. (Г) Полуколичественный анализ интенсивности флуоресценции белка клаудина-7 вдоль латеральной клеточной мембраны и ее апиальной трети ($n = 3$, * – $p < 0,05$, t-критерий Стьюдента). (Д) Оценка кишечной проницаемости *in vivo* с помощью 4 кДа FITC-декстрана ($n = 7$, * – $p < 0,05$, t-критерий Стьюдента). Данные, полученные автором диссертационной работы, опубликованы в [146]

3.10 Изучение влияния экзогенного церамида С6 на актиновый цитоскелет и межклеточные контакты в эпителии толстой кишки

Поскольку метаболомный анализ показал повышение уровня церамидов у животных с дефицитом белка муцина-2, в настоящем исследовании была поставлена задача выяснить, оказывает ли экзогенный церамид непосредственное влияние на барьер толстой кишки у

животных дикого типа. Для этого животным линии C57BL/6 (дикий тип) ректально вводили мицеллы церамида С6, имеющего короткую алкильную цепь.

Иммуногистохимическое окрашивание и последующий анализ интенсивности флуоресценции показали, что воздействие церамида сопровождается нарушением организации F-актина как в апикальной, так и в латеральной областях энтероцитов (Рисунок 16, А, Б, В). Эти данные подтверждают предположение о негативном влиянии церамидов на структуру актинового цитоскелета.

Тем не менее, оценка локализации белков межклеточных контактов выявила разнонаправленные эффекты. Окрашивание на белок β -катенин продемонстрировало его делокализацию с латеральной мембраны, что согласуется с ухудшением структуры цитоскелета (Рисунок 16, А, Г). Напротив, белок клаудин-7 имел повышенную концентрацию в зоне межклеточных контактов, что противоречит ожидаемым результатам (Рисунок 16, Б, Г).

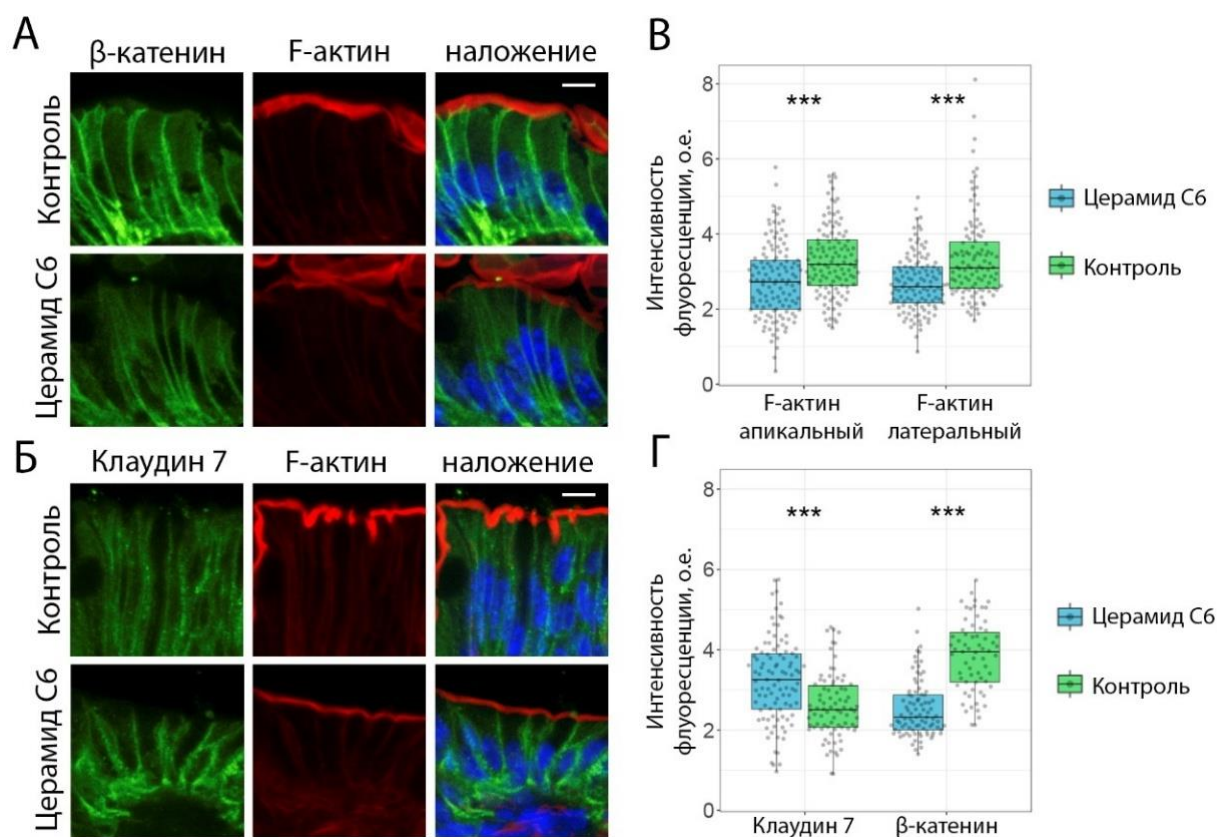


Рисунок 16. Эффект воздействия мицелл церамида С6 на эпителий толстой кишки животных дикого типа. (А, Б) Иммуноокрашивание на белки F-актин, клаудин-7 и β -катенин в нисходящей толстой кишке мышей дикого типа после ректального введения С6-церамида на 12 часов. Шкала – 10 мкм. Конфокальная микроскопия. (В, Г) Полуколичественная оценка интенсивности флуоресценции F-актина (В), белков клаудина-7 и β -катенина (Г) вдоль латеральной мембраны энтероцитов после воздействия мицелл церамида С6 ($n = 3$, *** – $p < 0,001$, U -критерий Манна-Уитни).

3.11 Влияние ингибирования церамидсинтаз на структуру F-актина и межклеточных контактов в толстой кишке мышей *Muc2^{-/-}*

С целью оценки вклада керамидов в нарушение архитектуры эпителия толстой кишки при хроническом неактивном воспалении, была исследована эффективность фармакологического ингибирования их синтеза. В качестве ингибитора церамидсинтаз использовали фумонизин В1. Учитывая токсичность фумонизина, его применяли локально в малых дозах путём ректального введения.

Иммуногистохимическое окрашивание показало, что ректальное введение фумонизина В1 способствует восстановлению структуры F-актина в эпителии толстой кишки животных с мутацией *Muc2^{-/-}* (Рисунок 17, А, Б, В). Эти данные подтверждают гипотезу о роли керамидов в нарушении организации актинового цитоскелета на фоне хронического воспаления.

Изменения также наблюдались в распределении белков межклеточных контактов. После введения фумонизина В1 для белка β -катенина была продемонстрирована усиленная мембранная локализация, тогда как содержание белка клаудин-7, напротив, оказалось снижено на мембранах (Рисунок 17, А, Б, В). Таким образом, эффект ингибирования биосинтеза керамидов был противоположен действию экзогенного введения С6-керамида, описанного ранее.

Функциональный тест на проницаемость *in vivo* показал, что ректальное введение фумонизина В1 достоверно снижает содержание FITC-декстрана в плазме крови *Muc2^{-/-}* животных (Рисунок 17, Г). Эти данные свидетельствуют о частичном восстановлении барьерной функции эпителия.

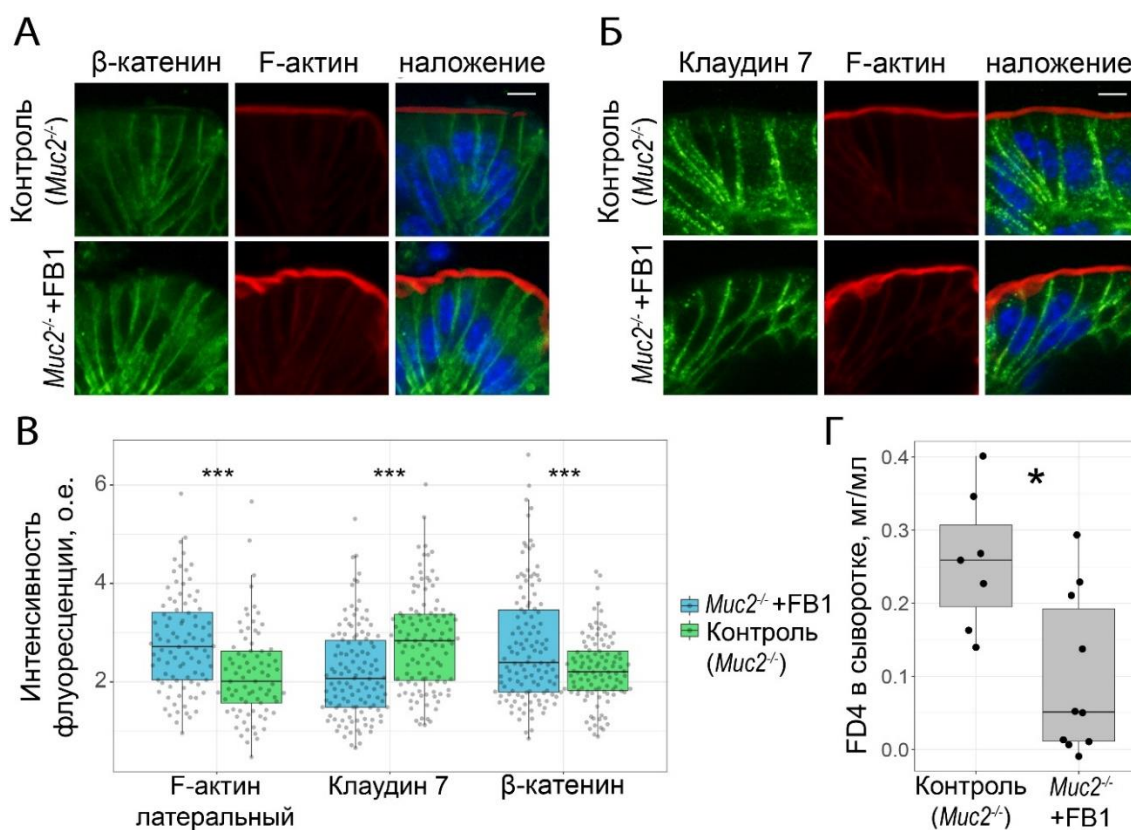


Рисунок 17. Эффект от воздействия фумонизина В1 (FB1) на эпителий толстой кишки животных *Muc2*^{-/-} (А, Б) Иммуноокрашивание на F-актин, белки клаудин-7 и β-катенин в нисходящей толстой кишке мышей *Muc2*^{-/-} после ректального введения фумонизина В1 через 12 часов. Конфокальная микроскопия. Шкала – 10 мкм. (В). Полуколичественный анализ интенсивности флуоресценции F-актина, белков клаудина-7 и β-катенина у *Muc2*^{-/-} мышей (n = 3, *** – p < 0,001, U-критерий Манна-Уитни). (Г) Оценка кишечной проницаемости *in vivo* с помощью FITC-декстрана 4 кДа после воздействия фумонизина В1 на эпителий толстой кишки животных *Muc2*^{-/-} (n = 7 контроль, n = 10 с введением FB1, * – p < 0,05, U-критерий Манна-Уитни).

3.12 Влияние ингибирования церамидсинтаз на структуру F-актина и межклеточных контактов в толстой кишке мышей с DSS-индуцированным колитом

Поскольку ранее была продемонстрирована эффективность фумонизина В1 в восстановлении структуры актинового цитоскелета и снижении проницаемости барьера у животных *Muc2*^{-/-}, в настоящем исследовании была предпринята попытка оценить влияние ингибирования биосинтеза церамидов на локализацию компонентов кишечного барьера в модели хронического колита, индуцированного DSS. Так как эта модель характеризуется морфологическими изменениями, сходными с моделью *Muc2*^{-/-}, можно предположить наличие схожих патогенетических механизмов.

Ректальное введение фумонизина B1 животным, получавшим DSS по схеме хронического колита, сопровождалось достоверным повышением уровня интенсивности флуоресценции F-актина в нисходящей толстой кишке (Рисунок 18, А, Б, В). Изменения в распределении белков межклеточных контактов носили неоднозначный характер. После обработки фумонизином B1 наблюдалось усиление локализации белка β -катенина на латеральной поверхности эпителиоцитов (Рисунок 18, А, В). В то же время локализация белка клаудина-7 не продемонстрировала значимых изменений (Рисунок 18, Б, В).

Полученные данные позволяют предположить, что механизм повышения проницаемости кишечного барьера при DSS-индуцированном колите также может включать избыточный синтез церамидов, вносящий вклад в нарушение актинового цитоскелета и дестабилизацию межклеточных контактов.

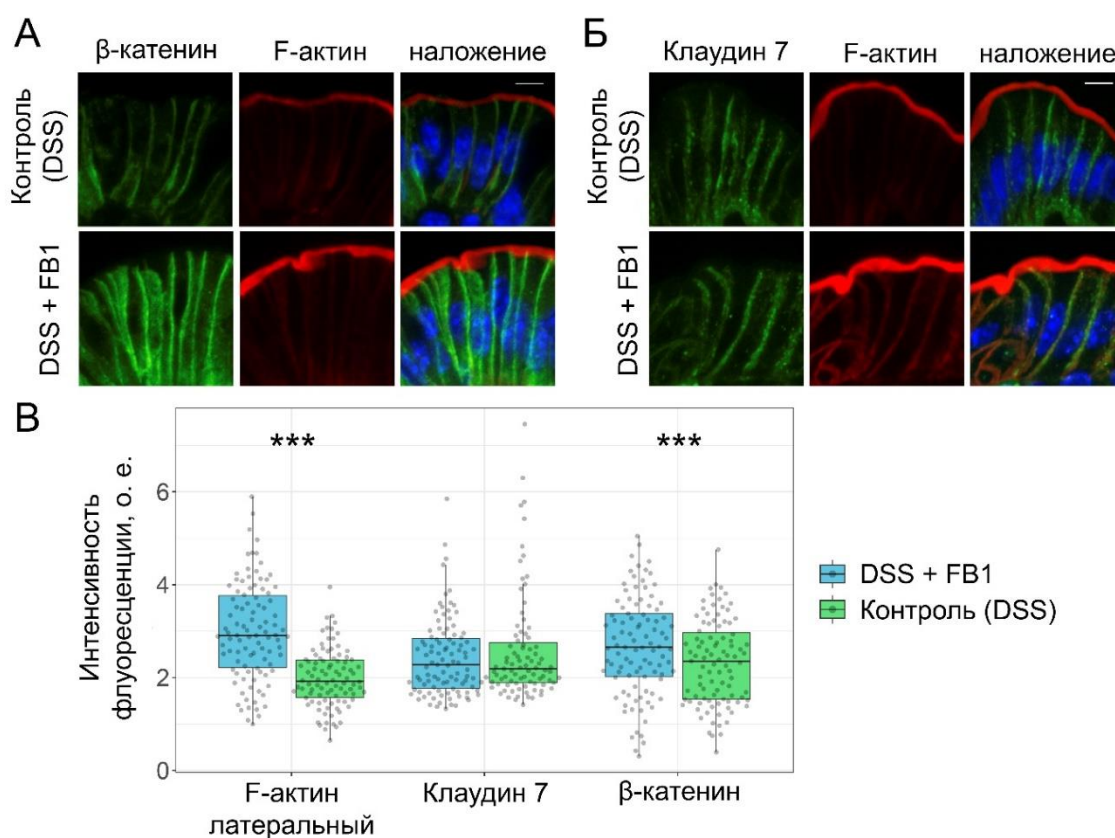


Рисунок 18. Эффект от воздействия фумонизина B1 (FB1) на эпителий толстой кишки животных с хроническим DSS-индуцированным воспалением. (А, Б) Иммуноокрашивание на F-актин, белки клаудин-7 и β -катенин в нисходящей толстой кишке мышей с хроническим DSS-индуцированным воспалением после ректального введения FB1 через 12 часов. Конфокальная микроскопия. Шкала – 10 мкм. (В). Полуколичественный анализ интенсивности флуоресценции F-актина, белков клаудина-7 и β -катенина у DSS-индуцированной модели (n = 3, *** – p < 0,001, U-критерий Манна-Уитни).

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

4.1 Особенности морфологии эпителиального барьера при хроническом воспалении на *ex vivo* и *in vitro* моделях

4.1.1 Органоиды толстой кишки

Органоиды представляют собой широко используемую *in vitro* модель для изучения свойств эпителия и подбора персонализированных методов лечения различных заболеваний [155–158]. В ряде исследований показано, что органоиды, полученные от пациентов с ВЗК или животных, моделирующих ВЗК и колоректальный рак, сохраняют морфологические и молекулярные свойства исходного кишечного эпителия [156, 159–163]. Тем не менее, результаты данной работы указывают на то, что органоиды, полученные из толстой кишки мышей с нокаутом гена *Muc2*, не воспроизводят характерное нарушение субклеточной локализации белка клаудина-7, установленное *in vivo*. Это может свидетельствовать о том, что в отсутствие воспалительного микроокружения эпителиальные клетки восстанавливают фенотип, соответствующий клеткам животных дикого типа.

Аналогичные результаты ранее были получены для органоидов, выделенных из двенадцатиперстной кишки собак с ВЗК [164]. Локализация белка клаудина-7 и ответ митохондрий на окислительный стресс в таких органоидах не отличались от таковых в контрольных органоидах. Кроме того, имеются данные, согласно которым органоиды, полученные от пациентов с ВЗК, не отличались по морфологии от органоидов, полученных из тканей здоровых доноров, и распределение белков плотных контактов (ПК) в образцах пациентов соответствовало контрольным образцам [165, 166]. В литературе опубликованы доказательства в пользу того, что органоиды, полученные от пациентов с ВЗК, теряют характерные особенности донорской ткани при отсутствии воспалительных стимулов [167, 168]. Отмечено также, что жизнеспособность и фенотип органоидов существенно зависят от степени выраженности воспалительного процесса в исходной ткани, что подчёркивает роль воспалительного микроокружения как ключевого регуляторного фактора [169]. Можно сделать вывод, что хроническое воспаление в ткани на фоне дефицита белка муцина-2 имеет определяющее значение для структуры эпителия. Эти наблюдения указывают на необходимость экспериментального подтверждения сохранности фенотипа исходной ткани при использовании органоидов в качестве моделей *in vitro*, что особенно актуально в контексте исследований ВЗК.

4.1.2 Экспланты и выделенные крипты толстой кишки

Разнообразные методики культивирования кишечных эксплантов *ex vivo*, описанные в литературе, позволяют сохранять ткани в условиях клеточной культуры в течение от 12-24 часов до нескольких суток [170–172]. В настоящем исследовании получены данные, свидетельствующие о том, что при культивировании эксплантов нисходящей толстой кишки в течение 30 часов эпителий остаётся жизнеспособным и характеризуется нормальной морфологией ядер клеток. Однако на этом этапе фиксируются выраженные изменения в субклеточной архитектуре структур эпителиального барьера, в частности, нарушается организация F-актина и плотных контактов. К 24 часам культивирования наблюдается частичное нарушение морфологических особенностей ткани: сохраняются отдельные фрагменты с интактной структурой, однако преобладающая часть эпителия демонстрирует признаки деградации.

Ранее было показано, что через 24 часа культивирования *ex vivo* по аналогичной методике кишечные экспланты теряют активность ферментов щеточной каёмки, включая щелочную фосфатазу, α -глюкозидазу и лейцил- β -нафтиламидазу [173]. Данные просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) также свидетельствуют о нарушениях ультраструктуры эпителия при длительной инкубации в условиях культуры. После 24-48 часов культивирования происходит смещение ядер в апикальную часть клеток, укорочение и разрушение микроворсинок, а также деструктуризация собственной пластинки [171, 174]. Известно, что актиновый цитоскелет энтероцитов характеризуется высокой пластичностью и способен быстро перестраиваться в ответ на внешние и механические воздействия [175]. Благодаря этим свойствам экспланты кишечника могут быть использованы в качестве надёжной модели для краткосрочных исследований эпителиального барьера. Совокупность литературных данных и результатов настоящей работы позволяет установить длительность экспериментальных процедур при аналогичных условиях культивирования не более 12-18 часов, поскольку именно в этом временном интервале сохраняется целостность ключевых структур барьера толстой кишки.

В литературе подчёркивается, что экспланты, полученные из эмбриональных тканей, обладают более высокой устойчивостью к культивированию *ex vivo*, поскольку находятся в состоянии активного морфогенеза, устойчивы к аноксии и имеют небольшой размер [171]. Несмотря на технические сложности при их извлечении, такие экспланты считаются предпочтительными для длительного культивирования, сохраняя жизнеспособность и структурную целостность на протяжении нескольких недель [176, 177].

Выделенные из ткани толстой кишки крипты можно рассматривать как *ex vivo* экспланты, редуцированные до простейшей структурной единицы эпителия толстой кишки. Известно, что отсутствие взаимодействий со внеклеточным матриксом индуцирует запрограммированную гибель энтероцитов [178, 179], поэтому для поддержания их жизнеспособности необходимо использовать матриксную подложку, которая имитирует базальную пластинку. В литературе описан протокол инкубации кишечных крипт в течение 3,5 часов в микропланшетах, предварительно покрытых матриксом. На протяжении указанного времени крипты сохраняли стабильный уровень базального OCR и жизнеспособность на уровне 90%, но теряли морфологическую целостность [145].

В настоящей работе после 3 часов культивирования аналогичным образом происходило нарушение структуры крипт и поляризации эпителия, которое сопровождалось дефектами локализации белков плотных контактов и F-актина. Сходные изменения были описаны в работе Фонти и соавторов: после культивирования крипт толстой кишки человека в течение 24-72 часов в клетках происходила перестройка F-актина и истончение щеточной каёмки, а электронно-микроскопический анализ показал деградацию микроворсинок при сохранности цитоплазматических органелл и соединительных комплексов [180]. Однако согласно более поздним исследованиям, для сохранения нормальной цитоморфологии крипты или эпителиальные клетки не следует культивировать более одного часа [181–183].

Таким образом, совместный анализ полученных в данной работе результатов и литературных данных позволяет утверждать, что крипты толстой кишки, в отличие от эксплантов кишечника, не являются оптимальным объектом для изучения свойств эпителиального барьера. Использование эксплантов сопряжено со строго ограниченным временным интервалом культивирования – не более 18 часов. Превышение этого времени приводит к утрате ключевых структур кишечного барьера – структуры F-актина и межклеточных контактов. Следует учитывать, что приведённые выводы актуальны для используемых в настоящей работе методик культивирования эксплантов и могут быть не применимы в более высокотехнологичных экспериментальных установках, например, в специализированных биореакторах.

4.2 Изменение экспрессии и локализации белков плотных и адгезивных контактов при воспалительных заболеваниях кишечника и в моделях воспаления

В ряде работ показано снижение уровней мРНК и/или белков, таких как JAM-A [90], ZO-1 [184], запирающих клаудинов, в том числе клаудина-7 [53, 185, 186], E-кадгерина [187–189], β -катенина [68] у пациентов с активным ВЗК [190]. Как правило, нарушение степени локализации указанных белков в эпителии сопутствует снижению экспрессии их генов. Вместе с тем, существуют исследования, в которых экспрессия компонентов ПК и адгезивных контактов (АК) при активном воспалении находилась на уровне контроля или даже повышалась, что подчёркивает гетерогенность клинических проявлений ВЗК [186, 189, 191, 192].

Существенная часть ранее описанных в литературе функциональных исследований кишечного барьера была проведена на фоне острого воспаления в кишечнике модельных животных или на культивируемых клетках после индукции воспалительного ответа с помощью липополисахаридов клеточной стенки бактерий или воспалительного цитокина IL-1. Значительно меньшее число работ посвящено оценке состояния межклеточных контактов в условиях хронического воспаления. В ранее опубликованной работе было показано, что в толстой кишке мышей *Muc2^{-/-}* наблюдается разрушение структуры F-актина и делокализация белка клаудина-3 с латеральной мембраны энтероцитов [12]. Полученные в настоящем исследовании данные дополняют эту картину, демонстрируя аналогичные нарушения в локализации белков клаудина-7, β -катенина и E-кадгерина. В модели хронического колита, индуцированного DSS, также выявлены нарушения структуры F-актина и изменения в локализации белков клаудина-7 и β -катенина, что указывает на наличие общих признаков у моделей хронического воспаления кишечника с различной этиологией.

Сопоставление с литературными источниками подтверждает, что у пациентов с язвенным колитом в фазе ремиссии уровни белков ПК и АК сопоставимы с показателями здоровых тканей, тогда как в состоянии обострения воспаления наблюдается их снижение [89, 193]. У пациентов с неактивным хроническим спондилоартритом, который ассоциирован с ВЗК [194], уровни белков β -катенина и E-кадгерина в толстой кишке не отличались от контрольных, в то время как при активном воспалении уровень белка E-кадгерина был повышен [195]. При вялотекущем язвенном колите было показано снижение

мембранной локализации белков клаудина-3 и -4 [196]. Можно предположить, что дисфункция кишечного барьера при неизменном уровне белков, входящих в состав ПК и АК, является отличительной чертой хронического «низкого» воспаления.

Следует отметить, что существуют исследования, согласно которым в хроническом DSS-индуцированном колите снижаются локализация и общий уровень белков β -катенина, E-кадгерина, ZO-1 и некоторых клаудинов [125, 197]. Хотя DSS-индуцируемый колит является своего рода классической моделью в исследовании ВЗК, данные, полученные с её помощью, требуют осторожной интерпретации, поскольку полученный фенотип в этой модели во многом зависит от линии мышей, дозы и схемы приёма DSS.

Согласно А. Иванову, дисфункция межклеточных контактов может быть обусловлена тремя механизмами: (1) изменением экспрессии генов, кодирующих белки контактов; (2) нарушением транспорта и мембранной локализации этих белков; (3) дестабилизацией актомиозиновых комплексов [68]. Учитывая отсутствие снижения экспрессии в условиях вялотекущего воспаления, наибольший интерес представляют второй и третий механизмы, которые рассматриваются в настоящей работе как ключевые.

Изменение субклеточной локализации трансмембранных белков, таких как клаудин-7 и E-кадгерин, может быть обусловлено их эндоцитозом, а цитоплазматического β -катенина - делокализацией из области АК. В клеточных моделях (монослой клеток T84, Caco-2, HT-29) показано, что воздействие воспалительных факторов (TNF- α , IFN- γ) приводит к повышенной проницаемости монослоя [190]. Это сопровождается изменением локализации, но не уровня белков окклюдина, JAM-A, клаудина-1 и -4. Важно отметить, что этот процесс подавляется ингибиторами эндоцитоза, что указывает на вовлечение мембранного транспорта при перемещении белков ПК с мембраны [190, 198, 199].

В литературе описан феномен быстрой интернализации антигенов в цитоплазму энтероцитов (rapid antigen uptake into the cytosol of enterocytes, RACE), характерный как для воспаленной, так и макроскопически здоровой слизистой оболочки кишечника пациентов с ВЗК [68]. Это явление характеризуется присутствием субпопуляции энтероцитов с изменённой ультраструктурой, которые обуславливают повышенный захват веществ из просвета кишки [200]. С учётом этого факта, делокализация белков ПК и АК на фоне хронического воспаления кишки может быть не специфическим процессом, а признаком высокой интенсивности эпителиального эндоцитоза в целом.

Особое внимание в данном исследовании уделено белкам клаудин-7 и β -катенин, выбранным в качестве маркёров ПК и АК, соответственно. Оба белка вовлечены в

регуляцию поддержания мультипотентности стволовых клеток кишечного эпителия. Известно, что полный нокаут гена *Cldn7* нарушает сигнальный путь Wnt/ β -катенин, снижая способность крипт к пролиферации и формированию органоидов [191]. Предполагается, что нарушение локализации белка клаудина-7 может приводить к повышенному фосфорилированию белка β -катенина, вызывая его смещение из области АК. Имеются сведения о том, что отсутствие белка β -катенина в составе АК не обязательно сопровождается нарушением барьерной функции эпителия [62]. С этой точки зрения, снижение локализации белка Е-кадгерина может быть решающим фактором, приводящим к дисфункции АК, поскольку белок β -катенин связан с цитоплазматическим доменом белка Е-кадгерина.

В совокупности, полученные данные указывают на то, что при хроническом низкоуровневом воспалении кишечника основным нарушением барьерной функции выступает делокализация белков межклеточных контактов при неизменённой экспрессии соответствующих генов. Это позволяет рассматривать перераспределение белков клаудин-7, β -катенин и других компонентов ПК и АК как маркёр нарушения целостности эпителия.

4.3 Нарушение динамики F-актина при хроническом воспалении и его влияние на межклеточные контакты

Актомиозиновый цитоскелет играет ключевую роль в поддержании морфологической целостности и функциональной устойчивости ПК и АК. Полученные в настоящем исследовании данные указывают на то, что изменение баланса между мономерной и полимерной формами актина приводит к нарушению не только структуры F-актина в энтероцитах, но и субклеточной локализации белков ПК и АК. Этот результат подтвердился и в функциональных тестах на проницаемость эпителиального барьера эпителиальных клеток кишечника в составе культивируемых органоидов.

Указанные наблюдения согласуются с литературными данными, полученными на культивируемых клетках T84, согласно которым латрункулин ингибирует полимеризацию вновь формирующихся микрофиламентов и межклеточных контактов [201, 202], в то время как уже сформированные комплексы контактов сохраняют относительную устойчивость [201]. Стабилизатор F-актина, джасплакинолид, напротив, стимулирует полимеризацию вновь образующихся микрофиламентов и способен поддерживать стабильность ПК [201].

Аналогичный эффект был показан и для белка Е-кадгерина в культивируемых клетках MDCK [203]. С другой стороны, воздействие джасплакинолида на культивируемые клетки Сасо-2 сопровождалось снижением интенсивности флуоресценции меченного F-актина, белков ПК и повышением проницаемости эпителиального монослоя [204]. Сходный эффект наблюдался и при ректальном введении этого соединения животным, что подтверждает чувствительность межклеточных контактов к дисбалансу в динамике цитоскелета.

Неоднозначный эффект джасплакинолида на F-актин, описанный в литературе, вероятно, обусловлен конкуренцией с фаллоидином за сайты связывания на актиновых филаментах [205, 206]. Это предположение подтверждается результатами, полученными с использованием альтернативного метода детекции – антител к актину. В культивируемых клетках линии A549 (альвеолярные клетки человека) было показано изменение локализации актина под воздействием джасплакинолида без снижения интенсивности общего сигнала [207]. Тем не менее, в настоящем исследовании джасплакинолид вызывал делокализацию белков клаудин-7 и β -катенин, а также тенденцию к повышению проницаемости в функциональном тесте, что позволяет рассматривать нарушение динамики полимеризации актина как фактор, влияющий на межклеточные контакты и барьерную функцию эпителия.

В литературе имеется множество свидетельств в пользу того, что воспалительные цитокины способствуют разрушению актинового цитоскелета в модельных монослоях эпителиальных клеток кишечника [208]. В то же время сведения относительно структурных изменений F-актина в условиях воспаления *in vivo* остаются фрагментарными и противоречивыми [209, 210]. Полученные в настоящем исследовании результаты подтверждают ранее описанное нарушение организации F-актина в толстой кишке мышей *Muc2^{-/-}* [12], а также демонстрируют аналогичные дефекты в DSS-индуцированной модели хронического колита. Это подтверждается данными, согласно которым DSS при воздействии на монослой клеток Сасо-2 или при употреблении мышами по схеме развития острого колита нарушает структуру F-актина, ПК и АК за счёт активации N-концевых киназ c-Jun [122]. В дальнейшем представляется перспективным исследование архитектуры актинового цитоскелета и его взаимодействия с комплексами межклеточных контактов в других моделях хронического воспаления кишечника. В частности, интерес представляет широко распространённая генетическая модель хронического колита на мышах с нокаутом гена *IL-10^{-/-}*, модель адоптивного переноса CD45Rb^{High} Т-клеток иммунодефицитным животным, а также анализ тканей пациентов с ВЗК в стадии ремиссии. Эти данные позволят

более точно охарактеризовать вклад нарушений структуры актинового цитоскелета в дестабилизацию межклеточных контактов при вялотекущем воспалении.

Обобщая результаты, можно заключить, что при хроническом воспалении нарушение организации F-актина в энтероцитах является одним из ключевых факторов, способствующих дестабилизации межклеточных контактов. Потеря структурной опоры приводит к делокализации белков межклеточных контактов и, как следствие, к повышенной проницаемости кишечного эпителия.

4.4 Влияние липидного метаболизма на барьерную функцию кишечного эпителия

Липиды играют важную роль в поддержании гомеостаза слизистой оболочки кишечника. Они не только являются компонентами плазматических мембран клеток, но и входят в состав защитного слизистого слоя, покрывающего эпителий, оказывая влияние на его барьерные свойства. Анализ метаболомных профилей животных с нокаутом гена *Muc2* в данном исследовании показал, что содержание фосфоглицеро- и сфинголипидов в эпителии толстой кишки мышей *Muc2*^{-/-} значительно повышено по сравнению с таковым животных дикого типа. Кроме того, выявлено повышение экспрессии гена *CerS3*, кодирующего церамидсинтазу 3 – фермент, вовлечённый в синтез церамидов.

В рамках настоящей работы проверялась гипотеза, о том, что избыточное накопление фосфо- и/или сфинголипидов может повышать проницаемость кишечного барьера. Эксперименты показали, что продолжительное и краткосрочное поступление фосфатидилсерина, фосфатидилхолина и фосфатидной кислоты с пищей не вызывает повышения проницаемости кишечника животных дикого типа, однако сопровождается выраженными нарушениями ультраструктуры и функции митохондрий.

В то же время, экзогенное введение церамида C6, представителя класса сфинголипидов, оказывало негативное воздействие на структуру F-актина, сопровождаясь изменением локализации белков, входящих в состав ПК и АК. Напротив, ингибирование синтеза церамидов с использованием фумонизина B1 в обеих моделях хронического колита (нокаут гена *Muc2* и DSS-индуцированный колит) приводило к восстановлению организации F-актина, локализации белка β -катенина на латеральной мембране энтероцитов и снижению проницаемости эпителия *in vivo*.

4.4.1 Влияние фосфолипидов на структуру и функцию митохондрий

Уровень содержания и соотношение классов фосфолипидов играет существенную роль в регуляции воспалительного процесса при заболеваниях кишечника [7]. В частности, фосфатидилхолин оказывает противовоспалительный эффект у пациентов с язвенным колитом [211–213], а фосфатидилсерин показан для профилактики заболеваний центральной нервной системы [214]. Фосфатидная кислота, являющаяся предшественником всех глицерофосфолипидов, необходима для поддержания активности сигнального каскада mTOR, который контролирует процессы клеточного роста и деления [215]. С другой стороны, имеются экспериментальные данные, указывающие на снижение жизнеспособности культивируемых клеток Caco-2 под воздействием фосфатидилхолина и фосфатидилсерина, в то время как клетки CCD-18Co (фибробласты толстой кишки человека) устойчивы к аналогичным воздействиям [216]. Важно отметить, что при пероральном приёме фосфолипиды подвергаются метаболическим превращениям как в просвете желудочно-кишечного тракта, так и в самих эпителиальных клетках, что может приводить к расхождению результатов, полученных *in vitro* и *in vivo* [217].

Результаты настоящей работы показали, что длительное потребление фосфолипидов с пищей вызывает накопление крупных липидных капель в межмембранном пространстве митохондрий, сопровождающееся деградацией этих органелл. Известно, что липидные капли в клетке формируются посредством отделения от мембран гладкого ЭПР [218]. Впоследствии они могут контактировать с другими органеллами, в том числе с митохондриями [218]. Тем не менее механизм, по которому липидные капли могли бы проникать внутрь митохондрий или образовываться в пределах этих органелл, на данный момент не описан. Согласно предположению Ляо и соавторов [219], подобные включения могут представлять собой механизм утилизации избыточных или неправильно организованных мембран, наблюдаемый, в частности, в уротелии мышей с нокаутом гена *Slx31* (сортирующий нексин 31). Липидные капли меньшего размера были обнаружены также в митохондриях энтероцитов контрольной группы. Опубликованные в литературе электронно-микроскопические изображения энтероцитов толстой кишки мышей также демонстрируют наличие липидных капель в митохондриях, что указывает на повсеместность данной морфологической особенности в клетках толстой кишки лабораторных животных [12, 220, 221]. Можно предположить, что такой механизм утилизации является вариантом нормы для энтероцитов толстой кишки, требующий дальнейшего изучения.

Диета с повышенным содержанием фосфолипидов приводит к увеличению количества и размеров липидных капель в митохондриях, снижению числа крист и появлению митохондрий с электронно-прозрачным матриксом, что, вероятно, делает эти органеллы менее восприимчивыми к веществам, нарушающим протонный градиент. У животных с генетически обусловленным дефицитом белка муцина-2 при воздействии 2,4-динитрофенола на крипты не происходило повышения потребления кислорода в митохондриях [12]. Снижение резервной дыхательной ёмкости (spare respiratory capacity) ограничивает способность клеток адаптироваться к метаболическому стрессу и может способствовать запуску апоптоза или злокачественному преобразованию [222]. Возможным механизмом нарушения дыхания митохондрий является изменение фосфолипидного состава внутренней митохондриальной мембраны. Со стороны межмембранного пространства большую часть фосфолипидного бислоя внутренней мембраны составляют кардиолипиды и фосфатидилэтаноламин, создающие отрицательное искривление мембраны [222–224]. Кардиолипиды благодаря отрицательно заряженным головным группам поддерживают мембранный потенциал. Снижение содержания кардиолипидов и фосфатидилэтаноламина может приводить к нарушению морфологии крист, изменению работы электрон-транспортной цепи и увеличению утечки протонов [223, 224]. Для DSS-индуцированной модели колита также было показано снижение активности комплексов II и IV цепи переноса электронов [225]. Нарушение структуры митохондрий в остром DSS-индуцированном колите на электронно-микроскопическом уровне напоминает фенотип митохондрий у муцин-дефицитных мышей и мышей дикого типа после фосфолипидной диеты: сниженное число крист и электрон-прозрачный матрикс [12, 226, 227].

Известно, что дисфункция митохондрий характерна для тканей кишечника пациентов с ВЗК и для клеток эпителия кишечника у модельных животных [228, 229]. Воздействие веществ, нарушающих протонный градиент митохондрий, на культивируемые клетки MDCK и LLC-PK способствует деполимеризации F-актина и дестабилизации межклеточных контактов [228, 230–232]. Однако в рамках данной работы нарушения функции митохондрий, вызванного фосфолипидной диетой, оказалось недостаточно для дестабилизации комплексов ПК и для снижения базового уровня потребления кислорода, описанного для митохондрий модели *Muc2^{-/-}* [12]. Морфометрический анализ просвета ПК и АК также не показал нарушений, описанных для животных с дефицитом белка муцина-2 [12]. Вероятно, выявленные на фоне богатой фосфолипидами диеты митохондриальные

изменения можно рассматривать как предикторы повышенной уязвимости эпителия к воспалительному стрессу.

Дополнительный интерес представляет потенциальное влияние фосфолипидов на актиновый цитоскелет. Существуют данные, согласно которым фосфатидилхолин ингибирует индуцируемую TNF- α перестройку F-актина и подавляет экспрессию провоспалительных генов в клетках Caco-2 [233]. Свободные длинно- и среднецепочечные жирные кислоты (пальмитиновая кислота, каприновая кислота) нарушают дифференциацию клеток кишечного эпителия, снижают выработку белка муцина-2, вызывают разборку F-актина и повышают проницаемость [234, 235]. Эти данные в совокупности с описанными в этой работе морфологическими и функциональными данными, подчёркивают необходимость дальнейшего изучения влияния фосфолипидов на цитоскелет и межклеточные контакты в условиях хронического воспаления.

4.4.2 Роль церамидов в регуляции проницаемости клеточного барьера

Церамиды, простейшие представители класса сфинголипидов, являются ключевыми медиаторами воспалительного ответа. В ряде моделей ВЗК наблюдается повышенный уровень церамидов в тканях кишечника [236–239]. Так, в модели хронического колита, индуцированного DSS, содержание церамидов увеличивалось на 71%, тогда как в модели колита с адоптивным переносом наивных Т-лимфоцитов увеличение их содержания достигало 160% [236]. Активация макрофагов липополисахаридами, цитокинами IL-1 или TNF- α также вызывала увеличение внутриклеточного уровня церамидов [240, 241]. В литературных данных было показано, что TNF- α и короткоцепочечные церамиды активируют транскрипционный фактор NF- κ B, вызывая апоптоз [242]. У пациентов с ВЗК обнаруживается повышенное содержание церамидов в эпителии кишечника, которое положительно коррелирует с уровнем воспаления [243, 244].

Сигнальная функция церамидов реализуется посредством активации протеинфосфатаз и протеинкиназ, в том числе атипичной протеинкиназы C ζ , вовлечённой в регуляцию архитектуры цитоскелета [245]. Это приводит к запуску сигнальных путей митоген-активируемой протеинкиназы (МАРК), приводя к воспалительному ответу и клеточной гибели [245]. Повышение уровня церамидов, как правило, инициирует апоптоз, однако одновременное повышение концентрации диацилглицерина (ДАГ) активирует процессы пролиферации и дифференцировки. Предположительно, ДАГ частично или полностью нивелирует эффекты сигналов, запускаемых церамидами, и сохраняет

возможность активации иных сигнальных путей [245]. Полученные в данном исследовании результаты показали, что у мышей линии *Muc2*^{-/-} наблюдается одновременное повышение уровней не только церамидов, но и фосфолипидов, которые синтезируются из ДАГ. Это может препятствовать накоплению ДАГ и, следовательно, усиливать проапоптотический эффект церамидов. Данный факт поднимает вопрос об интенсивности процессов апоптоза в эпителии кишки в состоянии хронического воспаления и влиянии этих процессов на проницаемость кишечного барьера. Ранее опубликованные данные, полученные с помощью электронной микроскопии, не зафиксировали обширного апоптоза в эпителии толстой кишки на модели *Muc2* [12]. Воздействие цитокина IL-1 стимулирует накопление церамидов в клеточных линиях кишечных эпителиоцитов, не вызывая при этом апоптоза [246], однако оценка уровня апоптоза на моделях хронического колита требует целенаправленного уточнения.

В литературе имеется множество подтверждений тому, что химически индуцированный колит сопровождается повышением активности сфингомиелиназ (СМаз) – ферментов, катализирующих распад сфингомиелина на церамид и фосфатидилхолин [247, 248]. Ингибитор СМаз SMA-7 уменьшает тяжесть поражения толстой кишки у мышей с DSS-индуцированным колитом [237, 247]. Активность кислой СМазы повышается как в культуре макрофагов, так и при воспалении кишечника *in vivo* [248, 249]. Щелочная СМаза, вероятно, способствует снижению воспаления, её активность у пациентов с ВЗК снижается [250, 251].

Альтернативным источником церамидов служит синтез *de novo* с помощью ферментов церамидсинтаз, кодируемых генами *CerS1-CerS6* [252]. Настоящее исследование выявило повышенную экспрессию гена *CerS3* в толстой кишке животных линии *Muc2*^{-/-}, тогда как в желудочно-кишечном тракте контрольных животных этот ген не экспрессируется или имеет очень низкий уровень экспрессии [252–254]. Оценка уровня транскриптов всех шести церамидсинтаз в модели с азоксиметан/DSS-индуцированным колитом показала, что большинство из них демонстрируют тенденцию к повышению экспрессии [255]. С другой стороны, модели с нокаутом генов *CerS4* и *CerS6* демонстрируют более тяжёлое течение DSS-индуцированного колита [256]. Согласно имеющимся данным, у некоторых пациентов с язвенным колитом показана аномально высокая экспрессия *CerS3*, связываемая с миграцией макрофагов в собственную пластинку [257]. В данной работе было показано, что при хроническом воспалении в генетической модели колита *Muc2*^{-/-} наблюдается повышенная экспрессия *CerS3* в тканях толстой кишки.

Эффект керамидов на биологические процессы во многом зависит от длины ацильной цепи отдельных керамидов. Так, при нокауте гена *CerS2* у мышей наблюдается снижение уровня длинноцепочечных керамидов C22-C24 и повышение содержания короткоцепочечных керамидов C16, что усиливает потерю веса и тяжесть поражений при употреблении DSS [140]. При этом воздействие фумонизина повышает проницаемость кишечного барьера, что свидетельствует в пользу того, что длинноцепочечные керамиды способствуют поддержанию барьерной функции [140]. В настоящей работе, напротив, было показано, что воздействие фумонизина B1 на эпителий толстой кишки с повышенным содержанием керамидов снижает патологическую проницаемость. Это противоречие может быть частично обусловлено различием природы этих моделей и способах введения фумонизина животным. Ким и соавторы вводили фумонизин B1 перорально, и длительное токсичное воздействие этого вещества на весь ЖКТ могло привести к повышению проницаемости [258], тогда как в настоящем исследовании это вещество использовали локально и однократно. Кроме того, в данной работе повышение уровня керамидов обусловлено гомологичным ферментом керамидсинтазой 3, который имеет отличную от керамидсинтазы 2 специфичность к длине жирной кислоты синтезируемых керамидов и создаёт иной керамидный профиль в клетках, чем нокаут гена *CerS2* [259, 260]. Керамидсинтаза 3 участвует в синтезе керамидов с длинной и очень длинной цепью (C22-26) [259], и повышение уровня таких керамидов в толстой кишке животных *Muc2^{-/-}* соотносится с опубликованными ранее данными о керамидном профиле пациентов с ВЗК в стадии обострения и в ремиссии [243, 257].

Экспериментальное моделирование повышения уровня керамидов проводилось с использованием короткоцепочечных керамидов C6. Короткоцепочечные керамиды C2-6 широко используются в экспериментах благодаря относительно эффективной доставке в клетки. Однако результаты, полученные с помощью керамидов C6, требуют осторожной интерпретации, поскольку коротко- и длинноцепочечные керамиды имеют различные физико-химические свойства, которые определяют кривизну и текучесть мембран [261]. Для более полной оценки эффекта введения короткоцепочечных керамидов на общий профиль сфинголипидов следует предусматривать метаболомное профилирование или таргетный анализ керамидов клеток и тканей.

В рамках настоящей работы было установлено, что накопление керамидов в эпителии толстой кишки вызывает дестабилизацию микрофиламентов актина, изменение локализации белков ПК и АК, и, как следствие, повышение параклеточной проницаемости. Эти результаты согласуются с имеющимися в литературе данными о влиянии керамидов на

архитектуру цитоскелета, поскольку аффинность связывания комплекса филаментов актина и миозиновых моторов с мембранами зависит от их липидного состава [262]. Литературные источники свидетельствуют о том, что распределение церамида в клетках примитивной эктодермы может быть связано с перестройкой F-актина при участии протеинкиназы C ζ/λ [263, 264]. Бок и соавторы показали, что экзогенная СМаза способствует концентрации церамидов во фракциях мембран, содержащих белки плотных контактов окклюдина и клаудина-4, вызывая повышение проницаемости монослоя Caco2 [265]. Их исследование позволило сделать вывод о том, что именно церамид может быть индуктором процессов, связанных с нарушением целостности кишечного барьера. Нокаут гена *CerS2*, как показано в работе Ким и соавторов, влияет на фосфорилирование лёгких цепей миозина II и повышает проницаемость в культуре клеток Caco-2 и *in vivo* [140], при этом не влияя на уровень белков ПК. В других исследованиях, напротив, наблюдалось снижение уровней белков ZO-1 и окклюдина в толстой кишке *CerS2^{-/-}* животных и в культуре Caco-2 [255]. Повышение уровня церамидов также описано при мутациях в гене *Apc* (аденоматозного полипоза толстой кишки), ассоциированных с нарушением регуляции RhoA и актинового цитоскелета [266]. В культуре альвеолярных клеток АЕСП церамиды повышают проницаемость монослоя дозозависимым образом [267].

Согласно литературным источникам, сфингозин влияет на локализацию белка β -катенина в моделях рака и клеточных культурах, делая его мембраноассоциированным [268]. Церамидсинтазы способны катализировать реакцию превращения сфингозина в церамид, возможно, этот процесс способствует делокализации белка β -катенина из области межклеточных контактов [252]. Такой механизм мог бы объяснить эффект воздействия мицелл церамида С6 и фумонизина В1 на изменение локализации белка β -катенина в настоящем исследовании.

Наконец, необходимо отметить два аспекта, касающиеся применения фумонизина В1. Во-первых, несмотря на достоверное снижение проницаемости, описанное в данной работе, не наблюдалось изменений локализации белка клаудина-7 в области ПК. С учётом контекст-зависимой функциональной изменчивости клаудина-7 [51], данный результат может указывать на возможную роль других белков семейства клаудинов, которые компенсируют отсутствие клаудина-7.

Во-вторых, фумонизин В1 представляет собой высокотоксичное соединение и не может рассматриваться как терапевтический агент [269]. В опубликованных работах указано, что фумонизин В1 ассоциирован с повреждением кишечника [270–272]. Продукты

метаболизма сфинголипидов могут вызывать злокачественные образования и воспаление [239, 269, 273]. Совокупность этих данных указывает на то, что потенциальная терапевтическая модуляция путей биосинтеза церамидов требует комплексного учёта системных и тканеспецифичных аспектов метаболизма.

4.4.3 Структурные и функциональные свойства церамид-содержащих липидных рафтов

Исследования физико-химических свойств мембран привели к формированию концепции липидных рафтов или плотов – микродоменов билипидного слоя, обладающих более высокой степенью упорядоченности по сравнению с окружающей мембраной. Понимание свойств и функций этих доменов необходимо для установления молекулярных механизмов, связывающих церамиды с регуляцией межклеточных контактов в эпителии кишечника.

Биофизические исследования модельных билипидных слоёв показали, что в зависимости от локального состава мембраны они могут находиться в гелеобразном, жидкоупорядоченном или жидконеупорядоченном фазовом состояниях, в порядке увеличения текучести. Липидные рафты или «плоты» представляют собой жидкоупорядоченные мембранные микродомены, обогащённые холестерином и насыщенными сфинголипидами, прежде всего – сфингомиелином и гликосфинголипидами [274]. Благодаря своим физико-химическим характеристикам фосфатидилэтаноламин и фосфатидилэтаноламин с насыщенными ацильными цепями также входят в состав липидных плотов [275]. Мембраны из фосфатидилхолина, напротив, сохраняют жидконеупорядоченное состояние и имеют меньшее сродство к холестерину, чем сфинголипиды [276]. Одним из важнейших свойств липидных рафтов является способность селективно накапливать трансмембранные и периферические белки, участвующие в передаче сигнала, транспортировке мембран и сортировке белков, в том числе G-белки, рецепторы TLR, элементы MAPK-каскада и протеинкиназы C [275]. Липидные рафты играют важную роль в эндоцитозе посредством локального обогащения кавеолином или флоттилином, либо образованием везикул под действием малых гуанозинтрифосфатаз [277]. Апикальная мембрана эпителиальных клеток, как правило, имеет множество доменов, обогащённых сфинголипидами и холестерином [278].

Церамиды способны образовывать водородные связи между собой, что обуславливает их способность к спонтанной агрегации в микродомены с высокой термической стабильностью [279]. Сдвиг баланса между сфингомиелином и церамидом в сторону

последнего сопровождается увеличением вязкости липидного плота и вытеснением из него холестерина [280, 281]. Холестерин важен для поддержания структуры и функции ПК. В экспериментах на культуре клеток было показано, что удаление холестерина с помощью метил- β -циклодекстрина нарушает локализацию белков плотных контактов, вызывает перестройку F-актина и снижает барьерную функцию эпителия [282, 283]. Вытеснение холестерина из липидных плотов может аналогичным образом приводить к потере белков ПК из соответствующих мембранных доменов и повышению параклеточной проницаемости [284, 285]. Например, воздействие экзогенной СМазы на монослой клеток Сасо-2 приводит к накоплению церамидов в ZO-1-позитивных микродоменах мембраны и нарушению функции ПК [265].

Как уже было отмечено в предыдущем разделе, длина ацильной цепи оказывает значительное влияние на физико-химические свойства церамидов. Литературные данные свидетельствуют о том, что короткоцепочечные церамиды, встраиваясь в липидные мембраны, повышают их текучесть и снижают плотность между компонентами липидного плота. В то же время, наиболее характерные для физиологических мембран длинноцепочечные церамиды, напротив, повышают степень упорядоченности мембраны [286, 287]. Ректальное введение короткоцепочечного церамида С6 мышам дикого типа приводило к нарушению целостности эпителиального барьера в толстой кишке. Однако остаётся неясным, обусловлен ли этот эффект накоплением церамидов как таковых или специфическим действием их короткой ацильной цепи. Существуют данные, что короткоцепочечные церамиды могут вовлекаться в метаболизм клетки и перерабатываться в длинноцепочечные формы [288], но степень и характер этих метаболических превращений требуют дальнейшего уточнения.

Связь между липидными рафтами и актиновым цитоскелетом представляется неоднозначной. С одной стороны, изменения состава липидных микродоменов способны инициировать перестройку микрофиламентов через Rho-зависимые механизмы [283, 289], включая церамидные микродомены [290]. С другой стороны, структурная устойчивость липидных плотов частично обусловлена их ассоциацией с микрофиламентами [291]. При деполимеризации актина, наблюдается дестабилизация рафтов, миграция ассоциированных белков из области рафта и повышение эндоцитоза [292, 293]. По-видимому, имеет место двунаправленное взаимодействие между F-актином и липидными плотами, обеспечивающее стабильность обоим субклеточным компонентам.

На основании результатов настоящей работы можно предположить, что дестабилизация липидных рафтов, индуцированная избыточным накоплением церамидов вследствие сверхэкспрессии *CerS3*, может инициировать каскад событий, приводящих к нарушению межклеточных контактов. Это предположение подтверждается исследованием [294], в котором был проведён сравнительный анализ липидных рафтов в различных моделях воспаления после обработки провоспалительными цитокинами. Клетки Caco-2, мыши с нокаутом *IL-10*, мыши с DSS-индуцированным колитом, а также образцы тканей пациентов с ВЗК продемонстрировали разрушение липидных рафтов в ответ на цитокины. При этом на моделях животных было установлено, что дезорганизация липидных рафтов происходит еще до повышения проницаемости эпителиального барьера [294]. На основании этого можно предположить, что именно нарушение микродоменов мембраны может служить отправной точкой в нарушении барьерной функции кишечника.

Таким образом, церамиды могут рассматриваться не только как сигнальные молекулы, но и как структурные регуляторы целостности эпителиального барьера. Результаты настоящей работы позволяют предположить, что нарушение липидной архитектуры мембран является одним из ранних процессов в развитии патогенеза при воспалении кишечника.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данная работа описывает внутриклеточные нарушения, сопутствующие повышенной проницаемости кишечника в моделях хронического колита у мышей. Было показано, что структура F-актина в клетках эпителия нисходящей кишки нарушена при хроническом воспалении разной этиологии: на фоне нокаута гена *Muc2* у мышей и у животных дикого типа при хроническом потреблении DSS. Вызванное таким образом воспаление сопровождается делокализацией белка плотных контактов клаудина-7 и белков адгезивных контактов β -катенина и E-кадгерина из латеральных мембран клеток.

F-актин служит основанием, на котором закрепляются комплексы плотных и адгезивных контактов. В рамках настоящей работы была показана непосредственная связь между стабильностью F-актина и локализацией плотных и адгезивных контактов в эпителии толстой кишки, на основании чего можно заключить, что на фоне воспаления именно нарушение структуры микрофиламентов является причиной дисфункции межклеточных контактов в изучаемых моделях.

Данные метаболомного анализа, полученные на животных *Muc2*^{-/-}, показали, что липиды могут быть потенциальными агентами, влияющими на проницаемость эпителия. Избыток фосфолипидов в рационе нарушает функцию и ультраструктуру митохондрий в энтероцитах, а обработка эпителия церамидом вызывает повреждение компонентов эпителиального барьера. Добавление ингибитора синтеза церамидов приводит к восстановлению организации F-актина и комплексов межклеточных контактов и у животных *Muc2*^{-/-}, и у мышей с длительным употреблением DSS. Следовательно, в исследуемых моделях хронического колита повышенные уровни церамидов могут быть причиной дестабилизации F-актина и, как следствие, структуры плотных и адгезивных контактов.

Итогом настоящей работы является установление связи «хроническое воспаление – накопление церамида – дестабилизация F-актина – делокализация белков клаудина-7 и β -катенина – повышение проницаемости кишечного барьера» в двух моделях хронического колита. Этот каскад послужит основой для дальнейших работ по установлению конкретных молекулярных механизмов, вовлечённых в развитие повышенной проницаемости кишечника. Понимание механизмов нарушения проницаемости эпителиального барьера является ключом к поиску новых путей коррекции этого состояния у пациентов с ВЗК, а также у людей с другими заболеваниями, сопровождающимися нарушением кишечного барьера.

ВЫВОДЫ

1. Хроническое воспаление кишечника приводит к нарушению организации F-актина и делокализации белков плотных и адгезивных контактов из области мембран энтероцитов толстой кишки.
2. Нарушение полимеризации F-актина вызывает изменение локализации белков клаудина-7 и β -катенина на латеральных мембранах энтероцитов толстой кишки мышей и нарушение функции межклеточных контактов.
3. Метаболомный профиль крипт толстой кишки характеризуется обогащением фосфолипидами и сфинголипидами на фоне хронического воспаления у мышей с нокаутом гена *Muc2*.
4. Экзогенные фосфолипиды вызывают структурные и функциональные нарушения митохондрий в энтероцитах толстой кишки, но не влияют на барьерную функцию кишечника.
5. Ингибирование церамидсинтаз приводит к восстановлению организации F-актина, локализации белка β -катенина на мембранах энтероцитов и частичному восстановлению барьерной функции кишечника в моделях хронического воспаления на мышах, тогда как добавление экзогенного церамида приводит к делокализации белка β -катенина и нарушению организации F-актина у мышей дикого типа.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Di Tommaso N, Gasbarrini A, Ponziani FR. Intestinal barrier in human health and disease. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2021;18.
2. D. C, Katsikeros R, M. S. Current and Novel Treatments for Ulcerative Colitis. In: *Ulcerative Colitis from Genetics to Complications*. 2012.
3. Xavier RJ, Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*. 2007;448.
4. Gismera CS, Aladrén BS. Inflammatory bowel diseases: A disease (s) of modern times? Is incidence still increasing? *World Journal of Gastroenterology*. 2008;14.
5. Walfish A, Companioni R. Overview of Inflammatory Bowel Disease - Gastrointestinal Disorders . MSD Manual Professional Edition. 2020.
6. Князев О, Шкурко Т, Каграманова А, Веселов А, Никонов Е. Эпидемиология воспалительных заболеваний кишечника. Современное состояние проблемы (обзор литературы). *Доказательная гастроэнтерология*. 2020;9.
7. Boldyreva L V., Morozova M V., Saydakova SS, Kozhevnikova EN. Fat of the gut: Epithelial phospholipids in inflammatory bowel diseases. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22.
8. Aleman RS, Moncada M, Aryana KJ. Leaky Gut and the Ingredients That Help Treat It: A Review. *Molecules*. 2023;28.
9. Fang H, E-Lacerda RR, Schertzer JD. Obesity promotes a leaky gut, inflammation and pre-diabetes by lowering gut microbiota that metabolise ethanolamine. *Gut*. 2023;72:1809–11.
10. Hu R, Yuan Y, Liu C, Zhou J, Ji L, Jiang G. New insights into the links between anti-diabetes drugs and gut microbiota. *Endocr Connect*. 2021;10:36–42.
11. Sandek A, Bauditz J, Swidsinski A, Buhner S, Weber-Eibel J, von Haehling S, et al. Altered Intestinal Function in Patients With Chronic Heart Failure. *J Am Coll Cardiol*. 2007;50:1561–9.
12. Borisova MA, Achasova KM, Morozova KN, Andreyeva EN, Litvinova EA, Ogienko AA, et al. Mucin-2 knockout is a model of intercellular junction defects, mitochondrial damage and ATP depletion in the intestinal epithelium. 2020. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78141-4>.
13. Binienda A, Twardowska A, Makaro A, Salaga M. Dietary carbohydrates and lipids in the pathogenesis of leaky gut syndrome: An overview. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21.
14. Vancamelbeke M, Vermeire S. The intestinal barrier: a fundamental role in health and disease. *Expert Review of Gastroenterology and Hepatology*. 2017;11.
15. Bankole E, Read E, Curtis MA, Neves JF, Garnett JA. The relationship between mucins and ulcerative colitis: A systematic review. *Journal of Clinical Medicine*. 2021;10.
16. Javitt G, Khmelnsky L, Albert L, Bigman LS, Elad N, Morgenstern D, et al. Assembly Mechanism of Mucin and von Willebrand Factor Polymers. *Cell*. 2020;183.

17. Sluis M Van der, Koning BAE De, Bruijn ACJM De, Velcich A, Meijerink JPP, Goudoever JB Van, et al. Muc2-Deficient Mice Spontaneously Develop Colitis, Indicating That MUC2 Is Critical for Colonic Protection. *Gastroenterology*. 2006;131:117–29.
18. Pinzón Martín S, Seeberger PH, Varón Silva D. Mucins and Pathogenic Mucin-Like Molecules Are Immunomodulators During Infection and Targets for Diagnostics and Vaccines. *Frontiers in Chemistry*. 2019;7.
19. Jakobsson HE, Rodríguez- Piñeiro AM, Schütte A, Ermund A, Boysen P, Bemark M, et al. The composition of the gut microbiota shapes the colon mucus barrier. *EMBO Rep*. 2015;16.
20. Cai R, Cheng C, Chen J, Xu X, Ding C, Gu B. Interactions of commensal and pathogenic microorganisms with the mucus layer in the colon. *Gut Microbes*. 2020;11.
21. Takiishi T, Fenero CIM, Câmara NOS. Intestinal barrier and gut microbiota: Shaping our immune responses throughout life. *Tissue Barriers*. 2017;5.
22. Everard A, Belzer C, Geurts L, Ouwerkerk JP, Druart C, Bindels LB, et al. Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110.
23. Jandhyala SM, Talukdar R, Subramanyam C, Vuyyuru H, Sasikala M, Reddy DN. Role of the normal gut microbiota. *World J Gastroenterol*. 2015;21.
24. Herath M, Hosie S, Bornstein JC, Franks AE, Hill-Yardin EL. The Role of the Gastrointestinal Mucus System in Intestinal Homeostasis: Implications for Neurological Disorders. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2020;10.
25. Gunawardene AR, Corfe BM, Staton CA. Classification and functions of enteroendocrine cells of the lower gastrointestinal tract. *International Journal of Experimental Pathology*. 2011;92.
26. Nelson CM. The mechanics of crypt morphogenesis. *Nat Cell Biol*. 2021;23.
27. Bischoff SC, Barbara G, Buurman W, Ockhuizen T, Schulzke JD, Serino M, et al. Intestinal permeability - a new target for disease prevention and therapy. *BMC Gastroenterology*. 2014;14.
28. Hendel SK, Kellermann L, Hausmann A, Bindsløv N, Jensen KB, Nielsen OH. Tuft Cells and Their Role in Intestinal Diseases. *Frontiers in Immunology*. 2022;13.
29. Schneider C, O’Leary CE, Locksley RM. Regulation of immune responses by tuft cells. *Nature Reviews Immunology*. 2019;19.
30. Dillon A, Lo DD. M cells: Intelligent engineering of mucosal immune surveillance. *Frontiers in Immunology*. 2019;10 JUL.
31. Snippert HJ. Colonic Crypts: Safe Haven from Microbial Products. *Cell*. 2016;165.
32. Bevins CL, Salzman NH. Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. *Nature Reviews Microbiology*. 2011;9.
33. Lueschow SR, McElroy SJ. The Paneth Cell: The Curator and Defender of the Immature Small Intestine. *Frontiers in Immunology*. 2020;11.
34. Uzman A. Molecular biology of the cell (4th ed.): Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. Biochemistry and Molecular Biology Education. 2003;31.

35. Okumura R, Takeda K. Roles of intestinal epithelial cells in the maintenance of gut homeostasis. *Experimental and Molecular Medicine*. 2017;49.
36. Yan F, Polk DB. Disruption of NF- κ B signalling by ancient microbial molecules: Novel therapies of the future? *Gut*. 2010;59.
37. Cario E. Barrier-protective function of intestinal epithelial toll-like receptor 2. *Mucosal Immunology*. 2008;1.
38. Belardi B, Hamkins-Indik T, Harris AR, Kim J, Xu K, Fletcher DA. A Weak Link with Actin Organizes Tight Junctions to Control Epithelial Permeability. *Dev Cell*. 2020;54.
39. Basmaciyan L, Bon F, Paradis T, Lapaquette P, Dalle F. “Candida Albicans Interactions With The Host: Crossing The Intestinal Epithelial Barrier.” *Tissue Barriers*. 2019;7.
40. Vanslebrouck B, Chen JH, Larabell C, van Hengel J. Microscopic Visualization of Cell-Cell Adhesion Complexes at Micro and Nanoscale. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2022;10.
41. Hu JCE, Weiß F, Bojarski C, Branchi F, Schulzke JD, Fromm M, et al. Expression of tricellular tight junction proteins and the paracellular macromolecule barrier are recovered in remission of ulcerative colitis. *BMC Gastroenterol*. 2021;21.
42. Raleigh DR, Marchiando AM, Zhang Y, Shen L, Sasaki H, Wang Y, et al. Tight junction-associated MARVEL proteins marvelD3, tricellulin, and occludin have distinct but overlapping functions. *Mol Biol Cell*. 2010;21.
43. Brown RC, Davis TP. Calcium modulation of adherens and tight junction function: A potential mechanism for blood-brain barrier disruption after stroke. *Stroke*. 2002;33.
44. Edelblum KL, Turner JR. The tight junction in inflammatory disease: communication breakdown. *Current Opinion in Pharmacology*. 2009;9.
45. Günzel D, Yu ASL. Claudins and the modulation of tight junction permeability. *Physiol Rev*. 2013;93.
46. Krause G, Winkler L, Mueller SL, Haseloff RF, Piontek J, Blasig IE. Structure and function of claudins. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*. 2008;1778.
47. Lal-Nag M, Morin JP. The claudins. *Genome Biol* . 2009;10.
48. Lameris AL, Huybers S, Kaukinen K, Mäkelä TH, Bindels RJ, Hoenderop JG, et al. Expression profiling of claudins in the human gastrointestinal tract in health and during inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol*. 2013;48.
49. Amasheh S, Schmidt T, Mahn M, Florian P, Mankertz J, Tavalali S, et al. Contribution of claudin-5 to barrier properties in tight junctions of epithelial cells. *Cell Tissue Res*. 2005;321.
50. Rahner C, Mitic LL, Anderson JM. Heterogeneity in expression and subcellular localization of claudins 2, 3, 4, and 5 in the rat liver, pancreas, and gut. *Gastroenterology*. 2001;120.
51. Capaldo CT. Claudin Barriers on the Brink: How Conflicting Tissue and Cellular Priorities Drive IBD Pathogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24.
52. Günzel D, Fromm M. Claudins and other tight junction proteins. *Compr Physiol*. 2012;2.

53. Wang K, Ding Y, Xu C, Hao M, Li H, Ding L. Cldn-7 deficiency promotes experimental colitis and associated carcinogenesis by regulating intestinal epithelial integrity. *Oncoimmunology*. 2021;10.
54. Fujita H, Chiba H, Yokozaki H, Sakai N, Sugimoto K, Wada T, et al. Differential expression and subcellular localization of claudin-7, -8, -12, -13, and -15 along the mouse intestine. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 2006;54.
55. Ding L, Lu Z, Foreman O, Tatum R, Lu Q, Renegar R, et al. Inflammation and disruption of the mucosal architecture in claudin-7-deficient mice. *Gastroenterology*. 2012;142.
56. Ladwein M, Pape UF, Schmidt DS, Schnölzer M, Fiedler S, Langbein L, et al. The cell-cell adhesion molecule EpCAM interacts directly with the tight junction protein claudin-7. *Exp Cell Res*. 2005;309.
57. van IJendoorn SCD, Agnetti J, Gassama-Diagne A. Mechanisms behind the polarized distribution of lipids in epithelial cells. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*. 2020;1862.
58. Nagafuchi A. Molecular architecture of adherens junctions. *Current Opinion in Cell Biology*. 2001;13.
59. Niessen CM, Gottardi CJ. Molecular components of the adherens junction. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*. 2008;1778.
60. Engert S, Burtscher I, Liao WP, Dulev S, Schotta G, Lickert H. Wnt/ β -catenin signalling regulates Sox17 expression and is essential for organizer and endoderm formation in the mouse. *Development (Cambridge)*. 2013;140.
61. Hoffmeyer K, Raggioli A, Rudloff S, Anton R, Hierholzer A, Del Valle I, et al. Wnt/ β -catenin signaling regulates telomerase in stem cells and cancer cells. *Science (1979)*. 2012;336.
62. Fevr T, Robine S, Louvard D, Huelsken J. Wnt/ β -Catenin Is Essential for Intestinal Homeostasis and Maintenance of Intestinal Stem Cells. *Mol Cell Biol*. 2007;27.
63. Miwa N, Furuse M, Tsukita S, Niikawa N, Nakamura Y, Furukawa Y. Involvement of claudin-1 in the β -catenin/Tcf signaling pathway and its frequent upregulation in human colorectal cancers. *Oncol Res*. 2000;12.
64. Gottardi CJ, Wong E, Gumbiner BM. E-cadherin suppresses cellular transformation by inhibiting β -catenin signaling in an adhesion-independent manner. *Journal of Cell Biology*. 2001;153.
65. Xing Y, Takemaru KI, Liu J, Berndt JD, Zheng JJ, Moon RT, et al. Crystal Structure of a Full-Length β -Catenin. *Structure*. 2008;16.
66. Amano M, Nakayama M, Kaibuchi K. Rho-kinase/ROCK: A key regulator of the cytoskeleton and cell polarity. *Cytoskeleton*. 2010;67.
67. Maekawa M, Ishizaki T, Boku S, Watanabe N, Fujita A, Iwamatsu A, et al. Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase. *Science (1979)*. 1999;285.

68. Lechuga S, Ivanov AI. Disruption of the epithelial barrier during intestinal inflammation: Quest for new molecules and mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. 2017;1864.
69. Quiros M, Nusrat A. RhoGTPases, actomyosin signaling and regulation of the Epithelial Apical Junctional Complex. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. 2014;36.
70. Samarin SN, Ivanov AI, Flatau G, Parkos CA, Nusrat A. Rho/Rho-associated kinase-II signaling mediates disassembly of epithelial apical junctions. *Mol Biol Cell*. 2007;18.
71. López-Posadas R, Becker C, Günther C, Tenzer S, Amann K, Billmeier U, et al. Rho-A prenylation and signaling link epithelial homeostasis to intestinal inflammation. *Journal of Clinical Investigation*. 2016;126.
72. Schwayer C, Shamipour S, Pranjic-Ferscha K, Schauer A, Balda M, Tada M, et al. Mechanosensation of Tight Junctions Depends on ZO-1 Phase Separation and Flow. *Cell*. 2019;179.
73. Drees F, Pokutta S, Yamada S, Nelson WJ, Weis WI. α -catenin is a molecular switch that binds E-cadherin- β -catenin and regulates actin-filament assembly. *Cell*. 2005;123.
74. Van Itallie CM, Fanning AS, Bridges A, Anderson JM. ZO-1 stabilizes the tight junction solute barrier through coupling to the perijunctional cytoskeleton. *Mol Biol Cell*. 2009;20.
75. Yang PC, He SH, Zheng PY. Investigation into the signal transduction pathway via which heat stress impairs intestinal epithelial barrier function. *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)*. 2007;22.
76. Lu Q, Yang MF, Liang YJ, Xu J, Xu HM, Nie YQ, et al. Immunology of Inflammatory Bowel Disease: Molecular Mechanisms and Therapeutics. *Journal of Inflammation Research*. 2022;15.
77. Silva FAR, Rodrigues BL, Ayrizono MDLS, Leal RF. The Immunological Basis of Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology Research and Practice*. 2016;2016.
78. Yeshi K, Ruscher R, Hunter L, Daly NL, Loukas A, Wangchuk P. Revisiting inflammatory bowel disease: Pathology, treatments, challenges and emerging therapeutics including drug leads from natural products. *Journal of Clinical Medicine*. 2020;9.
79. Albert-Bayo M, Paracuellos I, González-Castro AM, Rodríguez-Urrutia A, Rodríguez-Lagunas MJ, Alonso-Cotoner C, et al. Intestinal mucosal mast cells: Key modulators of barrier function and homeostasis. *Cells*. 2019;8.
80. Yue N, Hu P, Tian C, Kong C, Zhao H, Zhang Y, et al. Dissecting Innate and Adaptive Immunity in Inflammatory Bowel Disease: Immune Compartmentalization, Microbiota Crosstalk, and Emerging Therapies. *Journal of Inflammation Research* . 2024;17:9987–10014.
81. Mizoguchi A, Takeuchi T, Himuro H, Okada T, Mizoguchi E. Genetically engineered mouse models for studying inflammatory bowel disease. *Journal of Pathology*. 2016;238.
82. Tezuka H, Ohteki T. Regulation of IgA production by intestinal dendritic cells and related cells. *Frontiers in Immunology*. 2019;10 AUG.
83. Turner JR. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nature Reviews Immunology*. 2009;9.

84. Keir ME, Yi T, Lu TT, Ghilardi N. The role of IL-22 in intestinal health and disease. *Journal of Experimental Medicine*. 2020;217.
85. Su L, Shen L, Clayburgh DR, Nalle SC, Sullivan EA, Meddings JB, et al. Targeted Epithelial Tight Junction Dysfunction Causes Immune Activation and Contributes to Development of Experimental Colitis. *Gastroenterology*. 2009;136.
86. Andrews C, McLean MH, Durum SK. Cytokine tuning of intestinal epithelial function. *Front Immunol*. 2018;9 JUN.
87. Capaldo CT, Nusrat A. Cytokine regulation of tight junctions. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*. 2009;1788.
88. Capaldo CT, Farkas AE, Nusrat A. Epithelial adhesive junctions. *F1000Prime Reports*. 2014;6.
89. Gassler N, Rohr C, Schneider A, Kartenbeck J, Bach A, Obermüller N, et al. Inflammatory bowel disease is associated with changes of enterocytic junctions. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2001;281 1 44-1.
90. Vetrano S, Rescigno M, Rosaria Cera M, Correale C, Rumio C, Doni A, et al. Unique Role of Junctional Adhesion Molecule-A in Maintaining Mucosal Homeostasis in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology*. 2008;135.
91. Zeissig S, Bürgel N, Günzel D, Richter J, Mankertz J, Wahnschaffe U, et al. Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease. *Gut*. 2007;56.
92. Buschmann MM, Shen L, Rajapakse H, Raleigh DR, Wang Y, Wang Y, et al. Occludin OCEL-domain interactions are required for maintenance and regulation of the tight junction barrier to macromolecular flux. *Mol Biol Cell*. 2013;24.
93. Marchiando AM, Graham WV, Turner JR. Epithelial barriers in homeostasis and disease. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 2010;5.
94. Watari A, Sakamoto Y, Hisaie K, Iwamoto K, Fueta M, Yagi K, et al. Rebeccamycin attenuates TNF- α -induced intestinal epithelial barrier dysfunction by inhibiting myosin light chain kinase production. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2017;41.
95. Ye X, Sun M. AGR2 ameliorates tumor necrosis factor- α -induced epithelial barrier dysfunction via suppression of NF- κ B p65-mediated MLCK/p-MLC pathway activation. *Int J Mol Med*. 2017;39.
96. Cunningham KE, Turner JR. Myosin light chain kinase: Pulling the strings of epithelial tight junction function. *Ann N Y Acad Sci*. 2012;1258.
97. Segain JP, De la Blétière DR, Sauzeau V, Bourreille A, Hilaret G, Cario-Toumaniantz C, et al. Rho kinase blockade prevents inflammation via nuclear factor κ B inhibition: Evidence in Crohn's disease and experimental colitis. *Gastroenterology*. 2003;124.
98. Buhner S, Buning C, Genschel J, Kling K, Herrmann D, Dignass A, et al. Genetic basis for increased intestinal permeability in families with Crohn's disease: Role of CARD15 3020insC mutation? *Gut*. 2006;55.

99. Fries W, Renda MC, Lo Presti MA, Raso A, Orlando A, Oliva L, et al. Intestinal permeability and genetic determinants in patients, first-degree relatives, and controls in a high-incidence area of crohn's disease in Southern Italy. *American Journal of Gastroenterology*. 2005;100.
100. Soderholm JD, Peterson KH, Olaison G, Franzen LE, Westrom B, Magnusson KE, et al. Epithelial permeability to proteins in the noninflamed ileum of Crohn's disease? *Gastroenterology*. 1999;117.
101. Wyatt J, Vogelsang H, Hübl W, Waldhoer T, Lochs H. Intestinal permeability and the prediction of relapse in Crohn's disease. *The Lancet*. 1993;341.
102. Fukui H. Increased Intestinal Permeability and Decreased Barrier Function: Does It Really Influence the Risk of Inflammation? *Inflammatory Intestinal Diseases*. 2016;1.
103. Katinios G, Casado-Bedmar M, Walter SA, Vicario M, González-Castro AM, Bednarska O, et al. Increased Colonic Epithelial Permeability and Mucosal Eosinophilia in Ulcerative Colitis in Remission Compared with Irritable Bowel Syndrome and Health. *Inflamm Bowel Dis*. 2020;26.
104. Planell N, Lozano JJ, Mora-Buch R, Masamunt MC, Jimeno M, Ordás I, et al. Transcriptional analysis of the intestinal mucosa of patients with ulcerative colitis in remission reveals lasting epithelial cell alterations. *Gut*. 2013;62.
105. Grauso M, Lan A, Andriamihaja M, Bouillaud F, Blachier F. Hyperosmolar environment and intestinal epithelial cells: impact on mitochondrial oxygen consumption, proliferation, and barrier function in vitro. *Sci Rep*. 2019;9.
106. JanssenDuijghuijsen LM, Grefte S, de Boer VCJ, Zeper L, van Dartel DAM, van der Stelt I, et al. Mitochondrial ATP depletion disrupts Caco-2 monolayer integrity and internalizes claudin 7. *Front Physiol*. 2017;8 OCT.
107. Lanis JM, Kao DJ, Alexeev EE, Colgan SP. Tissue metabolism and the inflammatory bowel diseases. *Journal of Molecular Medicine*. 2017;95.
108. Peng L, Li ZR, Green RS, Holzman IR, Lin J. Butyrate enhances the intestinal barrier by facilitating tight junction assembly via activation of AMP-activated protein kinase in Caco-2 cell monolayers. *Journal of Nutrition*. 2009;139.
109. Goyal N, Rana A, Ahlawat A, Bijjem KR V., Kumar P. Animal models of inflammatory bowel disease: A review. *Inflammopharmacology*. 2014;22.
110. Ostanin D V., Bao J, Koboziev I, Gray L, Robinson-Jackson SA, Kosloski-Davidson M, et al. T cell transfer model of chronic colitis: Concepts, considerations, and tricks of the trade. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2009;296.
111. Jamwal S, Kumar P. Animal Models of Inflammatory Bowel Disease. In: *Animal Models for the Study of Human Disease: Second Edition*. Elsevier Inc.; 2017. p. 467–77.
112. Wirtz S, Popp V, Kindermann M, Gerlach K, Weigmann B, Fichtner-Feigl S, et al. Chemically induced mouse models of acute and chronic intestinal inflammation. *Nat Protoc*. 2017;12.
113. Randhawa PK, Singh K, Singh N, Jaggi AS. A review on chemical-induced inflammatory bowel disease models in rodents. *Korean Journal of Physiology and Pharmacology*. 2014;18.

114. Waldner MJ, Neurath MF. Chemically induced mouse models of colitis. *Current Protocols in Pharmacology*. 2009; SUPPL. 46.
115. Mizoguchi A. Animal models of inflammatory bowel disease. In: *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. 2012.
116. Dong F, Zhang L, Hao F, Tang H, Wang Y. Systemic responses of mice to dextran sulfate sodium-induced acute ulcerative colitis using ¹H NMR spectroscopy. *J Proteome Res*. 2013;12.
117. Mennigen R, Nolte K, Rijcken E, Utech M, Loeffler B, Senninger N, et al. Probiotic mixture VSL#3 protects the epithelial barrier by maintaining tight junction protein expression and preventing apoptosis in a murine model of colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2009;296.
118. Poritz LS, Garver KI, Green C, Fitzpatrick L, Ruggiero F, Koltun WA. Loss of the Tight Junction Protein ZO-1 in Dextran Sulfate Sodium Induced Colitis. *Journal of Surgical Research*. 2007;140.
119. Wu B, Zhou Q, He Z, Wang X, Sun X, Chen Y. Protective Effect of the *Abelmoschus manihot* Flower Extract on DSS-Induced Ulcerative Colitis in Mice. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. 2021;2021.
120. Yuan B, Zhou S, Lu Y, Liu J, Jin X, Wan H, et al. Changes in the expression and distribution of claudins, increased epithelial apoptosis, and a mannan-binding lectin-associated immune response lead to barrier dysfunction in dextran sodium sulfate-induced rat colitis. *Gut Liver*. 2015;9.
121. Xia XM, Wang FY, Zhou J, Hu KF, Li SW, Zou BB. CXCR4 antagonist AMD3100 modulates claudin expression and intestinal barrier function in experimental colitis. *PLoS One*. 2011;6.
122. Samak G, Chaudhry KK, Gangwar R, Narayanan D, Jaggar JH, Rao RK. Calcium/Ask1/MKK7/JNK2/c-Src signalling cascade mediates disruption of intestinal epithelial tight junctions by dextran sulfate sodium. *Biochemical Journal*. 2015;465.
123. Oz HS, Chen TS, McClain CJ, De Villiers WJS. Antioxidants as novel therapy in a murine model of colitis. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 2005;16.
124. Riemschneider S, Hoffmann M, Slanina U, Weber K, Hauschildt S, Lehmann J. Indol-3-carbinol and quercetin ameliorate chronic dss-induced colitis in c57bl/6 mice by ahr-mediated anti-inflammatory mechanisms. *Int J Environ Res Public Health*. 2021;18.
125. Zhao C, Wang D, Wu M, Luo Y, Yang M, Guo J, et al. Tumor necrosis factor ligand-related molecule 1A affects the intestinal mucosal barrier function by promoting Th9/interleukin-9 expression. *Journal of International Medical Research*. 2020;48.
126. Cui J, Li Y, Jiao C, Gao J, He Y, Nie B, et al. Improvement of magnesium isoglycyrrhizinate on DSS-induced acute and chronic colitis. *Int Immunopharmacol*. 2021;90.
127. Guo D, Yang J, Ling F, Tu L, Li J, Chen Y, et al. Elemental Diet Enriched with Amino Acids Alleviates Mucosal Inflammatory Response and Prevents Colonic Epithelial Barrier Dysfunction in Mice with DSS-Induced Chronic Colitis. *J Immunol Res*. 2020;2020.

128. Jiang Z, Mu W, Yang Y, Sun M, Liu Y, Gao Z, et al. Cadmium exacerbates dextran sulfate sodium-induced chronic colitis and impairs intestinal barrier. *Science of the Total Environment*. 2020;744.
129. Wang L, Shao L, Chen MY, Wang L, Zhang W, Tan FB, et al. Effect of ginsenoside compound K on alleviating colitis via modulating gut microbiota. *Chinese Medicine (United Kingdom)*. 2022;17.
130. Sharma A, Tirpude NV, Kumari M, Padwad Y. Rutin prevents inflammation-associated colon damage: Via inhibiting the p38/MAPKAPK2 and PI3K/Akt/GSK3 β /NF- κ B signalling axes and enhancing splenic Tregs in DSS-induced murine chronic colitis. *Food Funct*. 2021;12.
131. Velcich A, Yang WC, Heyer J, Fragale A, Nicholas C, Viani S, et al. Colorectal cancer in mice genetically deficient in the mucin Muc2. *Science* (1979). 2002;295.
132. Johansson MEV, Phillipson M, Petersson J, Velcich A, Holm L, Hansson GC. The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105.
133. Tadesse S, Corner G, Dhima E, Houston M, Guha C, Augenlicht L, et al. MUC2 mucin deficiency alters inflammatory and metabolic pathways in the mouse intestinal mucosa. *Oncotarget*. 2017;8.
134. Bergstrom KSB, Kisson-Singh V, Gibson DL, Ma C, Montero M, Sham HP, et al. Muc2 protects against lethal infectious colitis by disassociating pathogenic and commensal bacteria from the colonic mucosa. *PLoS Pathog*. 2010;6.
135. Zarepour M, Bhullar K, Montero M, Ma C, Huang T, Velcich A, et al. The mucin muc2 limits pathogen burdens and epithelial barrier dysfunction during salmonella enterica serovar typhimurium colitis. *Infect Immun*. 2013;81.
136. Leon-Coria A, Kumar M, Workentine M, Moreau F, Surette M, Chadee K. Muc2 Mucin and Nonmucin Microbiota Confer Distinct Innate Host Defense in Disease Susceptibility and Colonic Injury. *CMGH*. 2021;11.
137. Lu P, Burger-Van Paassen N, Van Der Sluis M, Witte-Bouma J, Kerckaert JP, Van Goudoever JB, et al. Colonic gene expression patterns of mucin muc2 knockout mice reveal various phases in colitis development. *Inflamm Bowel Dis*. 2011;17.
138. Sovran B, Loonen LMP, Lu P, Hugenholtz F, Belzer C, Stolte EH, et al. IL-22-STAT3 pathway plays a key role in the maintenance of ileal homeostasis in mice lacking secreted mucus barrier. *Inflamm Bowel Dis*. 2015;21.
139. Ye J, Haskey N, Dadlani H, Zubaidi H, Barnett JA, Ghosh S, et al. Deletion of mucin 2 induces colitis with concomitant metabolic abnormalities in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2021;320.
140. Kim YR, Volpert G, Shin KO, Kim SY, Shin SH, Lee Y, et al. Ablation of ceramide synthase 2 exacerbates dextran sodium sulphate-induced colitis in mice due to increased intestinal permeability. *J Cell Mol Med*. 2017;21.
141. Helke K, Angel P, Lu P, Garrett-Mayer E, Ogretmen B, Drake R, et al. Ceramide Synthase 6 Deficiency Enhances Inflammation in the DSS model of Colitis. *Sci Rep*. 2018;8.

142. Gu Y, Forostyan T, Sabbadini R, Rosenblatt J. Epithelial cell extrusion requires the sphingosine-1-phosphate receptor 2 pathway. *Journal of Cell Biology*. 2011;193.
143. Miyoshi H, Stappenbeck TS. In vitro expansion and genetic modification of gastrointestinal stem cells in spheroid culture. *Nat Protoc*. 2013;8.
144. Gracz AD, Puthoff BJ, Magness ST. Identification, isolation, and culture of intestinal epithelial stem cells from murine intestine. *Methods in Molecular Biology*. 2012;879.
145. Fan YY, Davidson LA, Callaway ES, Wright GA, Safe S, Chapkin RS. A bioassay to measure energy metabolism in mouse colonic crypts, organoids, and sorted stem cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2015;309.
146. Saydakova S, Morozova K, Snytnikova O, Morozova M, Boldyreva L, Kiseleva E, et al. The Effect of Dietary Phospholipids on the Ultrastructure and Function of Intestinal Epithelial Cells. *Int J Mol Sci*. 2023;24.
147. Fletcher PS, Elliott J, Grivel JC, Margolis L, Anton P, McGowan I, et al. Ex vivo culture of human colorectal tissue for the evaluation of candidate microbicides. *AIDS*. 2006;20.
148. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72.
149. Conroy MJ, Andrews RM, Andrews S, Cockayne L, Dennis EA, Fahy E, et al. LIPID MAPS: update to databases and tools for the lipidomics community. *Nucleic Acids Res*. 2024;52:1677–82.
150. Wishart DS, Guo AC, Oler E, Wang F, Anjum A, Peters H, et al. HMDB 5.0: The Human Metabolome Database for 2022. *Nucleic Acids Res*. 2022;50:622–31.
151. Pang Z, Chong J, Zhou G, De Lima Morais DA, Chang L, Barrette M, et al. MetaboAnalyst 5.0: Narrowing the gap between raw spectra and functional insights. *Nucleic Acids Res*. 2021;49:388–96.
152. Kanehisa M, Goto S. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Res*. 2000;28:27–30.
153. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*. 2009;55:611–22.
154. Co JY, Margalef-Català M, Monack DM, Amieva MR. Controlling the polarity of human gastrointestinal organoids to investigate epithelial biology and infectious diseases. *Nature Protocols*. 2021;16.
155. Sato T, Stange DE, Ferrante M, Vries RGJ, Van Es JH, Van Den Brink S, et al. Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium. *Gastroenterology*. 2011;141.
156. d'Aldebert E, Quaranta M, Sébert M, Bonnet D, Kirzin S, Portier G, et al. Characterization of Human Colon Organoids From Inflammatory Bowel Disease Patients. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8.
157. Zhang M, Liu Y, Chen YG. Generation of 3D human gastrointestinal organoids: principle and applications. *Cell Regeneration*. 2020;9.

158. Tian C mei, Yang M feng, Xu H ming, Zhu M zheng, Yue NN, Zhang Y, et al. Stem cell-derived intestinal organoids: a novel modality for IBD. *Cell Death Discovery*. 2023;9.
159. Almeqdadi M, Mana MD, Roper J, Yilmaz ÖH. Gut organoids: Mini-tissues in culture to study intestinal physiology and disease. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2019;317.
160. Wakisaka Y, Sugimoto S, Sato T. Organoid Medicine for Inflammatory Bowel Disease. *Stem Cells*. 2022;40.
161. O'Connell L, Winter DC, Aherne CM. The Role of Organoids as a Novel Platform for Modeling of Inflammatory Bowel Disease. *Frontiers in Pediatrics*. 2021;9.
162. Sarvestani SK, Signs S, Hu B, Yeu Y, Feng H, Ni Y, et al. Induced organoids derived from patients with ulcerative colitis recapitulate colitic reactivity. *Nat Commun*. 2021;12.
163. Dotti I, Mayorgas A, Salas A. Generation of human colon organoids from healthy and inflammatory bowel disease mucosa. *PLoS One*. 2022;17 10 October.
164. Csukovich G, Huainig J, Troester S, Pratscher B, Burgener IA. The Intricacies of Inflammatory Bowel Disease: A Preliminary Study of Redox Biology in Intestinal Organoids. *Organoids*. 2023;2.
165. Howell KJ, Kraiczy J, Nayak KM, Gasparetto M, Ross A, Lee C, et al. DNA Methylation and Transcription Patterns in Intestinal Epithelial Cells From Pediatric Patients With Inflammatory Bowel Diseases Differentiate Disease Subtypes and Associate With Outcome. *Gastroenterology*. 2018;154.
166. Xu P, Becker H, Elizalde M, Masclee A, Jonkers D. Intestinal organoid culture model is a valuable system to study epithelial barrier function in IBD. *Gut*. 2018;67.
167. Edgar RD, Perrone F, Foster AR, Payne F, Lewis S, Nayak KM, et al. Culture-Associated DNA Methylation Changes Impact on Cellular Function of Human Intestinal Organoids. *CMGH*. 2022;14.
168. Arnauts K, Verstockt B, Ramalho AS, Vermeire S, Verfaillie C, Ferrante M. Ex Vivo Mimicking of Inflammation in Organoids Derived From Patients With Ulcerative Colitis. *Gastroenterology*. 2020;159.
169. Ding W, Marx OM, Mankarious MM, Koltun WA, Yochum GS. Disease Severity Impairs Generation of Intestinal Organoid Cultures From Inflammatory Bowel Disease Patients. *Journal of Surgical Research*. 2024;293:187.
170. De Souza Cortez BR, Guedes RMC. A review on the evolution of methods for intestinal in vitro organ culture and its application in veterinary science. *Vet World*. 2023;16:347.
171. Randall KJ, Turton J, Foster JR. Explant culture of gastrointestinal tissue: A review of methods and applications. *Cell Biol Toxicol*. 2011;27:267–84.
172. Udden SMN, Waliullah S, Harris M, Zaki H. The ex vivo colon organ culture and its use in antimicrobial host defense studies. *Journal of Visualized Experiments*. 2017;120:55347.
173. Danielsen EM, Cowell GM. Biosynthesis of intestinal microvillar proteins. *FEBS Lett*. 1985;190.

174. Mitchell JD, Mitchell J, Peters TJ. Enzyme changes in human small bowel mucosa during culture in vitro. *Gut*. 1974;15:805–11.
175. Ubelmann F, Chamaillard M, El-Marjou F, Simon A, Netter J, Vignjevic D, et al. Enterocyte loss of polarity and gut wound healing rely upon the F-actin-severing function of villin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110:1380–9.
176. Quinlan JM, Yu WY, Hornsey MA, Tosh D, Slack JMW. In vitro culture of embryonic mouse intestinal epithelium: Cell differentiation and introduction of reporter genes. *BMC Dev Biol*. 2006;6:1–11.
177. Abud HE, Watson N, Heath JK. Growth of intestinal epithelium in organ culture is dependent on EGF signalling. *Exp Cell Res*. 2005;303:252–62.
178. Cameron O, Neves JF, Gentleman E. Listen to Your Gut: Key Concepts for Bioengineering Advanced Models of the Intestine. *Advanced Science*. 2024;11:2302165.
179. Seidelin JB, Horn T, Nielsen OH. Simple and efficient method for isolation and cultivation of endoscopically obtained human colonocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2003;285:1122–8.
180. Fonti R, Latella G, Bises G, Magliocca F, Nobili F, Caprilli R, et al. Human colonocytes in primary culture: a model to study epithelial growth, metabolism and differentiation. *Int J Colorectal Dis*. 1994;9:13–22.
181. Danielsen EM, Hansen GH. Probing paracellular -versus transcellular tissue barrier permeability using a gut mucosal explant culture system. *Tissue Barriers*. 2019;7:1601955.
182. Dacosta RS, Andersson H, Cirocco M, Marcon NE, Wilson BC. Autofluorescence characterisation of isolated whole crypts and primary cultured human epithelial cells from normal, hyperplastic, and adenomatous colonic mucosa. *J Clin Pathol*. 2005;58:766–74.
183. Chen L, Vasoya RP, Toke NH, Parthasarathy A, Luo S, Chiles E, et al. HNF4 Regulates Fatty Acid Oxidation and Is Required for Renewal of Intestinal Stem Cells in Mice. *Gastroenterology*. 2020;158:985–99.
184. Kuo WT, Zuo L, Odenwald MA, Madha S, Singh G, Gurniak CB, et al. The Tight Junction Protein ZO-1 Is Dispensable for Barrier Function but Critical for Effective Mucosal Repair. *Gastroenterology*. 2021;161:1924–39.
185. Oshima T, Miwa H, Joh T. Changes in the expression of claudins in active ulcerative colitis. *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)*. 2008;23:146–50.
186. Luettig J, Rosenthal R, Barmeyer C, Schulzke JD. Claudin-2 as a mediator of leaky gut barrier during intestinal inflammation. *Tissue Barriers*. 2015;3:e977176.
187. Mehta S, Nijhuis A, Kumagai T, Lindsay J, Silver A. Defects in the adherens junction complex (E-cadherin/ β -catenin) in inflammatory bowel disease. *Cell Tissue Res*. 2015;360:749–60.
188. Robinson SC, Chaudhary R, Jiménez-Saiz R, Rayner LGA, Bayer L, Jordana M, et al. Kaiso-induced intestinal inflammation is preceded by diminished E-cadherin expression and intestinal integrity. *PLoS One*. 2019;14:e0217220.

189. Ohta H, Sunden Y, Yokoyama N, Osuga T, Lim SY, Tamura Y, et al. Expression of apical junction complex proteins in duodenal mucosa of dogs with inflammatory bowel disease. *Am J Vet Res.* 2014;75:746–51.
190. Ivanov AI, Nusrat A, Parkos CA. The epithelium in inflammatory bowel disease: Potential role of endocytosis of junctional proteins in barrier disruption. In: Novartis Foundation Symposium 263. Chichester, UK: John Wiley & Sons; 2004. p. 115–32.
191. Xing T, Benderman LJ, Sabu S, Parker J, Yang J, Lu Q, et al. Tight Junction Protein Claudin-7 Is Essential for Intestinal Epithelial Stem Cell Self-Renewal and Differentiation. *CMGH.* 2020;9:641–59.
192. Fredericks E, Dealtry G, Roux S. β -Catenin Regulation in Sporadic Colorectal Carcinogenesis: Not as Simple as APC. *Can J Gastroenterol Hepatol.* 2018;2018:4379673.
193. Kucharzik T, Walsh S V., Chen J, Parkos CA, Nusrat A. Neutrophil transmigration in inflammatory bowel disease is associated with differential expression of epithelial intercellular junction proteins. *American Journal of Pathology.* 2001;159:2001–9.
194. Fragoulis GE, Liava C, Daoussis D, Akriviadis E, Garyfallos A, Dimitroulas T. Inflammatory bowel diseases and spondyloarthropathies: From pathogenesis to treatment. *World J Gastroenterol.* 2019;25:2162.
195. Demetter P, Cuvelier CA, Mielants H, Veys EM, Baeten D, De Keyser F, et al. Subclinical gut inflammation in spondyloarthropathy patients is associated with upregulation of the E-cadherin/catenin complex. *Ann Rheum Dis.* 2000;59:211–6.
196. Prasad S, Mingrino R, Kaukinen K, Hayes KL, Powell RM, MacDonald TT, et al. Inflammatory processes have differential effects on claudins 2, 3 and 4 in colonic epithelial cells. *Laboratory Investigation.* 2005;85.
197. Di Gregorio J, Sferra R, Specia S, Vetusch A, Dubuquoy C, Desreumaux P, et al. Role of glycogen synthase kinase-3 β and PPAR- γ on epithelial-to-mesenchymal transition in DSS-induced colorectal fibrosis. *PLoS One.* 2017;12:e0171093.
198. Bruewer M, Utech M, Ivanov AI, Hopkins AM, Parkos CA, Nusrat A. Interferon- γ induces internalization of epithelial tight junction proteins via a macropinocytosis-like process. *The FASEB Journal.* 2005;19:923–33.
199. Bruewer M, Luegering A, Kucharzik T, Parkos CA, Madara JL, Hopkins AM, et al. Proinflammatory Cytokines Disrupt Epithelial Barrier Function by Apoptosis-Independent Mechanisms. *The Journal of Immunology.* 2003;171:6164–72.
200. Kersting S, Bruewer M, Schuermann G, Klotz A, Utech M, Hansmerten M, et al. Antigen transport and cytoskeletal characteristics of a distinct enterocyte population in inflammatory bowel diseases. *American Journal of Pathology.* 2004;165:425–37.
201. Ivanov AI, Hunt D, Utech M, Nusrat A, Parkos CA. Differential roles for actin polymerization and a myosin II motor in assembly of the epithelial apical junctional complex. *Mol Biol Cell.* 2005;16:2636–50.
202. Ramirez-Velez I, Belardi B. Storming the gate: New approaches for targeting the dynamic tight junction for improved drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2023;199:114905.

203. Le TL, Joseph SR, Yap AS, Stow JL. Protein kinase C regulates endocytosis and recycling of E-cadherin. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2002;283:489–99.
204. Song H, Zhang J, He W, Wang P, Wang F. Activation of Cofilin Increases Intestinal Permeability via Depolymerization of F-Actin During Hypoxia in vitro. *Front Physiol*. 2019;10:1455.
205. Shurety W, Stewart NL, Stow JL. Fluid-phase markers in the basolateral endocytic pathway accumulate in response to the actin assembly-promoting drug Jasplakinolide. *Mol Biol Cell*. 1998;9:957–75.
206. Holzinger A, Blaas K. Actin-dynamics in plant cells: The function of actin-perturbing substances: Jasplakinolide, chondramides, phalloidin, cytochalasins, and latrunculins. In: *Cytoskeleton Methods and Protocols*. New York, NY: Springer New York; 2016. p. 243–61.
207. Huang Y, Haas C, Ghadiali SN. Influence of transmural pressure and cytoskeletal structure on NF- κ B activation in respiratory epithelial cells. *Cell Mol Bioeng*. 2010;3:415–27.
208. Musch MW, Walsh-Reitz MM, Chang EB. Roles of ZO-1, occludin, and actin in oxidant-induced barrier disruption. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006;290:222–31.
209. Ivanov AI, Parkos CA, Nusrat A. Cytoskeletal regulation of epithelial barrier function during inflammation. *American Journal of Pathology*. 2010;177:512–24.
210. Oshitani N, Watanabe K, Nakamura S, Fujiwara Y, Higuchi K, Arakawa T. Dislocation of tight junction proteins without F-actin disruption in inactive Crohn's disease. *Int J Mol Med*. 2005;15:407–10.
211. Stremmel W, Merle U, Zahn A, Autschbach F, Hinz U, Ehehalt R. Retarded release phosphatidylcholine benefits patients with chronic active ulcerative colitis. *Gut*. 2005;54:966–71.
212. Stremmel W, Ehehalt R, Autschbach F, Karner M. Phosphatidylcholine for steroid-refractory chronic ulcerative colitis: A randomized trial. *Ann Intern Med*. 2007;147:603–10.
213. Karner M, Kocjan A, Stein J, Schreiber S, Von Boyen G, Uebel P, et al. First multicenter study of modified release phosphatidylcholine LT-02 in ulcerative colitis: A randomized, placebo-controlled trial in mesalazine-refractory courses. *American Journal of Gastroenterology*. 2014;109:1041–51.
214. Glade MJ, Smith K. Phosphatidylserine and the human brain. *Nutrition*. 2015;31:781–6.
215. Foster DA. Phosphatidic acid and lipid-sensing by mTOR. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 2013;24:272–8.
216. Hossain Z, Konishi M, Hosokawa M, Takahashi K. Effect of polyunsaturated fatty acid-enriched phosphatidylcholine and phosphatidylserine on butyrate-induced growth inhibition, differentiation and apoptosis in Caco-2 cells. *Cell Biochem Funct*. 2006;24:159–65.
217. Wang B, Tontonoz P. Phospholipid Remodeling in Physiology and Disease. *Annu Rev Physiol*. 2019;81:165–88.
218. Olzmann JA, Carvalho P. Dynamics and functions of lipid droplets. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2019;20:137–55.

219. Liao Y, Tham DKL, Liang FX, Chang J, Wei Y, Sudhir PR, et al. Mitochondrial lipid droplet formation as a detoxification mechanism to sequester and degrade excessive urothelial membranes. *Mol Biol Cell*. 2019;30:2969–84.
220. Yang W, Liu R, Xu F. Glial-Derived Neurotrophic Factor Improves Impaired Colonic Motility in Mice of Ulcerative Colitis through Connexin 43. *Preprints (Basel)*. 2024;2024072059:1–18.
221. Shi C, Li H, Qu X, Huang L, Kong C, Qin H, et al. High fat diet exacerbates intestinal barrier dysfunction and changes gut microbiota in intestinal-specific ACF7 knockout mice. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2019;110:537–45.
222. Marchetti P, Fovez Q, Germain N, Khamari R, Kluza J. Mitochondrial spare respiratory capacity: Mechanisms, regulation, and significance in non-transformed and cancer cells. *FASEB Journal*. 2020;34:13106–24.
223. Ikon N, Ryan RO. Cardiolipin and mitochondrial cristae organization. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*. 2017;1859:1156–63.
224. Pennington ER, Funai K, Brown DA, Shaikh SR. The role of cardiolipin concentration and acyl chain composition on mitochondrial inner membrane molecular organization and function. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. 2019;1864:1039–52.
225. Santhanam S, Rajamanickam S, Motamarri A, Ramakrishna BS, Amirtharaj JG, Ramachandran A, et al. Mitochondrial electron transport chain complex dysfunction in the colonic mucosa in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis*. 2012;18:2158–68.
226. Kong J, Xiang Q, Shi G, Xu Z, Ma X, Wang Y, et al. Licorice protects against ulcerative colitis via the Nrf2/PINK1-mediated mitochondrial autophagy. *Immun Inflamm Dis*. 2023;11:e757.
227. Yeganeh PR, Leahy J, Spahis S, Patey N, Desjardins Y, Roy D, et al. Apple peel polyphenols reduce mitochondrial dysfunction in mice with DSS-induced ulcerative colitis. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 2018;57:56–66.
228. Novak EA, Mollen KP. Mitochondrial dysfunction in inflammatory bowel disease. *Front Cell Dev Biol*. 2015;3 OCT:62.
229. Boyapati RK, Dorward DA, Tamborska A, Kalla R, Ventham NT, Doherty MK, et al. Mitochondrial DNA is a pro-inflammatory damage-associated molecular pattern released during active IBD. *Inflamm Bowel Dis*. 2018;24:2113–22.
230. Tsukamoto T, Nigam SK. Tight junction proteins form large complexes and associate with the cytoskeleton in an ATP depletion model for reversible junction assembly. *Journal of Biological Chemistry*. 1997;272:16133–9.
231. Bacallao R, Garfinkel A, Monke S, Zampighi G, Mandel LJ. ATP depletion: A novel method to study junctional properties in epithelial tissues. I. Rearrangement of the actin cytoskeleton. *J Cell Sci*. 1994;107:3301–13.
232. Golenhofen N, Doctor RB, Bacallao R, Mandel LJ. Actin and villin compartmentation during ATP depletion and recovery in renal cultured cells. *Kidney Int*. 1995;48:1837–45.

233. Treede I, Braun A, Sparla R, Kühnel M, Giese T, Turner JR, et al. Anti-inflammatory effects of phosphatidylcholine. *Journal of Biological Chemistry*. 2007;282:27155–64.
234. Filippello A, Di Mauro S, Scamporrino A, Torrisi SA, Leggio GM, Di Pino A, et al. Molecular Effects of Chronic Exposure to Palmitate in Intestinal Organoids: A New Model to Study Obesity and Diabetes. *Int J Mol Sci*. 2022;23:7751.
235. Söderholm JD, Olaison G, Peterson KH, Franzén LE, Lindmark T, Wirén M, et al. Augmented increase in tight junction permeability by luminal stimuli in the non-inflamed ileum of crohn's disease. *Gut*. 2002;50:307–13.
236. Bauer J, Liebisch G, Hofmann C, Huy C, Schmitz G, Obermeier F, et al. Lipid alterations in experimental murine colitis: Role of ceramide and imipramine for matrix metalloproteinase-1 expression. *PLoS One*. 2009;4:e7197.
237. Sakata A, Ochiai T, Shimeno H, Hikishima S, Yokomatsu T, Shibuya S, et al. Acid sphingomyelinase inhibition suppresses lipopolysaccharide-mediated release of inflammatory cytokines from macrophages and protects against disease pathology in dextran sulphate sodium-induced colitis in mice. *Immunology*. 2007;122:54–64.
238. Shores DR, Binion DG, Freeman BA, Baker PRS. New insights into the role of fatty acids in the pathogenesis and resolution of inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2011;17:2192–204.
239. Suh JH, Saba JD. Sphingosine-1-phosphate in inflammatory bowel disease and colitis-associated colon cancer: The fat's in the fire. *Transl Cancer Res*. 2015;4:469.
240. MacKichan ML, DeFranco AL. Role of ceramide in lipopolysaccharide (LPS)-induced signaling. LPS increases ceramide rather than acting as a structural homolog. *Journal of Biological Chemistry*. 1999;274:1767–75.
241. Schilling JD, Machkovech HM, He L, Sidhu R, Fujiwara H, Weber K, et al. Palmitate and lipopolysaccharide trigger synergistic ceramide production in primary macrophages. *Journal of Biological Chemistry*. 2013;288:2923–32.
242. Kitajima I, Soejima Y, Takasaki I, Beppu H, Tokioka T, Maruyama I. Ceramide-induced nuclear translocation of NF- κ B is a potential mediator of the apoptotic response to TNF- α in murine clonal osteoblasts. *Bone*. 1996;19:263–70.
243. Diab J, Hansen T, Goll R, Stenlund H, Ahnlund M, Jensen E, et al. Lipidomics in Ulcerative Colitis Reveal Alteration in Mucosal Lipid Composition Associated with the Disease State. *Inflamm Bowel Dis*. 2019;25:1780–7.
244. Suh JH, Degagné É, Gleghorn EE, Setty M, Rodriguez A, Park KT, et al. Sphingosine-1-Phosphate Signaling and Metabolism Gene Signature in Pediatric Inflammatory Bowel Disease: A Matched-case Control Pilot Study. *Inflamm Bowel Dis*. 2018;24:1321–34.
245. Spiegel S, Foster D, Kolesnick R. Signal transduction through lipid second messengers. *Curr Opin Cell Biol*. 1996;8:159–67.
246. Homaidan FR, El-Sabban ME, Chakroun I, El-Sibai M, Dbaiibo GS. IL-1 stimulates ceramide accumulation without inducing apoptosis in intestinal epithelial cells. *Mediators Inflamm*. 2002;11:39–45.

247. Sakata A, Yasuda K, Ochiai T, Shimeno H, Hikishima S, Yokomatsu T, et al. Inhibition of lipopolysaccharide-induced release of interleukin-8 from intestinal epithelial cells by SMA, a novel inhibitor of sphingomyelinase and its therapeutic effect on dextran sulphate sodium-induced colitis in mice. *Cell Immunol.* 2007;245:24–31.
248. Xiong Y, Zhu XD, Wan P, Ren YP, Wang C, Yan RW, et al. Inhibition of ASM activity ameliorates DSS-induced colitis in mice. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2019;140:26–30.
249. Medina TP, Pan J, Damoah C, Humbert J, Köpnick AL, Will O, et al. Utilizing Sphingomyelinase Sensitizing Liposomes in Imaging Intestinal Inflammation in Dextran Sulfate Sodium-Induced Murine Colitis. *Biomedicines.* 2022;10:413.
250. Tian Y, Li X, Wang X, Pei ST, Pan HX, Cheng YQ, et al. Alkaline sphingomyelinase deficiency impairs intestinal mucosal barrier integrity and reduces antioxidant capacity in dextran sulfate sodium-induced colitis. *World J Gastroenterol.* 2024;30:1405.
251. Sjöqvist U, Hertervig E, Nilsson Å, Duan RD, Öst Å, Tribukait B, et al. Chronic colitis is associated with a reduction of mucosal alkaline sphingomyelinase activity. *Inflamm Bowel Dis.* 2002;8:258–63.
252. Li Y, Nicholson RJ, Summers SA. Ceramide signaling in the gut. *Mol Cell Endocrinol.* 2022;544:111554.
253. Park JW, Park WJ, Futerman AH. Ceramide synthases as potential targets for therapeutic intervention in human diseases. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids.* 2014;1841:671–81.
254. Hayama T, Hama K, Ozawa T, Fujiwara Y, Nozawa K, Matsuda K, et al. Ceramide synthase CERS4 gene downregulation is associated with KRAS mutation in colorectal cancer. *Sci Rep.* 2023;13:16249.
255. Oertel S, Scholich K, Weigert A, Thomas D, Schmetzer J, Trautmann S, et al. Ceramide synthase 2 deficiency aggravates AOM-DSS-induced colitis in mice: role of colon barrier integrity. *Cellular and Molecular Life Sciences.* 2017;74:3039–55.
256. Doll CL, Snider AJ. The diverse roles of sphingolipids in inflammatory bowel disease. *The FASEB Journal.* 2024;38:e23777.
257. Bazarganipour S, Hausmann J, Oertel S, El-Hindi K, Brachtendorf S, Blumenstein I, et al. The lipid status in patients with ulcerative colitis: Sphingolipids are disease-dependent regulated. *J Clin Med.* 2019;8:971.
258. Spiegel S, Merrill AH. Sphingolipid metabolism and cell growth regulation. *The FASEB Journal.* 1996;10:1388–97.
259. Levy M, Futerman AH. Mammalian ceramide synthases. *IUBMB Life.* 2010;62:347–56.
260. Hartmann D, Lucks J, Fuchs S, Schiffmann S, Schreiber Y, Ferreirós N, et al. Long chain ceramides and very long chain ceramides have opposite effects on human breast and colon cancer cell growth. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology.* 2012;44:620–8.
261. Sot J, Goñi FM, Alonso A. Molecular associations and surface-active properties of short- and long-N-acyl chain ceramides. *Biochim Biophys Acta Biomembr.* 2005;1711:12–9.

262. Liu X, Shu S, Billington N, Williamson CD, Yu S, Brzeska H, et al. Mammalian nonmuscle myosin II binds to anionic phospholipids with concomitant dissociation of the regulatory light chain. *Journal of Biological Chemistry*. 2016;291:24828–37.
263. Bieberich E. Ceramide signaling in cancer and stem cells. *Future Lipidol*. 2008;3:273–300.
264. Krishnamurthy K, Wang G, Silva J, Condie BG, Bieberich E. Ceramide regulates atypical PKC ζ/λ -mediated cell polarity in primitive ectoderm cells: A novel function of sphingolipids in morphogenesis. *Journal of Biological Chemistry*. 2007;282:3379–90.
265. Bock J, Liebisch G, Schweimer J, Schmitz G, Rogler G. Exogenous sphingomyelinase causes impaired intestinal epithelial barrier function. *World J Gastroenterol*. 2007;13:5217–25.
266. Jukes Z, Freier A, Glymenaki M, Brown R, Parry L, Want E, et al. Lipid profiling of mouse intestinal organoids for studying APC mutations. *Biosci Rep*. 2021;41:BSR20202915.
267. Yang J, Wang Y, Liu H, Bi J, Lu Y. C2-ceramide influences alveolar epithelial barrier function by downregulating Zo-1, occludin and claudin-4 expression. *Toxicol Mech Methods*. 2017;27:293–7.
268. Schmelz EM, Roberts PC, Kustin EM, Lemonnier LA, Sullards MC, Dillehay DL, et al. Modulation of intracellular β -catenin localization and intestinal tumorigenesis in vivo and in vitro by sphingolipids. *Cancer Res*. 2001;61:6723–9.
269. Chen J, Wei Z, Wang Y, Long M, Wu W, Kuca K. Fumonisin B1: Mechanisms of toxicity and biological detoxification progress in animals. *Food and Chemical Toxicology*. 2021;149:111977.
270. Li M, Liu S, Tan L, Luo Y, Gao Z, Liu J, et al. Fumonisin B1 induced intestinal epithelial barrier damage through endoplasmic reticulum stress triggered by the ceramide synthase 2 depletion. *Food and Chemical Toxicology*. 2022;166:113263.
271. Li X, Cao C, Zhu X, Li X, Wang K. Fumonisin B1 exposure triggers intestinal tract injury via activating nuclear xenobiotic receptors and attracting inflammation response. *Environmental Pollution*. 2020;267:115461.
272. Bouhet S, Hourcade E, Loiseau N, Fikry A, Martinez S, Roselli M, et al. The mycotoxin fumonisin B1 alters the proliferation and the barrier function of porcine intestinal epithelial cells. *Toxicological Sciences*. 2004;77:165–71.
273. Liang J, Nagahashi M, Kim EY, Harikumar KB, Yamada A, Huang WC, et al. Sphingosine-1-Phosphate Links Persistent STAT3 Activation, Chronic Intestinal Inflammation, and Development of Colitis-Associated Cancer. *Cancer Cell*. 2013;23:107–20.
274. Simons K, Toomre D. Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2000;1:31–9.
275. Chakraborty M, Jiang XC. Sphingomyelin and Its Role in Cellular Signaling. In: Capelluto DG, editor. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Dordrecht: Springer; 2013. p. 1–14.
276. Harder T, Simons K. Caveolae, DIGs, and the dynamics of sphingolipid-cholesterol microdomains. *Curr Opin Cell Biol*. 1997;9:534–42.

277. El-Sayed A, Harashima H. Endocytosis of gene delivery vectors: From clathrin-dependent to lipid raft-mediated endocytosis. *Molecular Therapy*. 2013;21:1118–30.
278. Giepmans BNG, van IJendoorn SCD. Epithelial cell-cell junctions and plasma membrane domains. *Biochim Biophys Acta Biomembr*. 2009;1788:820–31.
279. Kinoshita M, Matsumori N. Inimitable Impacts of Ceramides on Lipid Rafts Formed in Artificial and Natural Cell Membranes. *Membranes (Basel)*. 2022;12:727.
280. Yu C, Alterman M, Dobrowsky RT. Ceramide displaces cholesterol from lipid rafts and decreases the association of the cholesterol binding protein caveolin-1. *J Lipid Res*. 2005;46:1678–91.
281. Zhang Y, Li X, Becker KA, Gulbins E. Ceramide-enriched membrane domains-structure and function. *Biochim Biophys Acta Biomembr*. 2009;1788:178–83.
282. Lynch RD, Francis SA, McCarthy KM, Casas E, Thiele C, Schneeberger EE. Cholesterol depletion alters detergent-specific solubility profiles of selected tight junction proteins and the phosphorylation of occludin. *Exp Cell Res*. 2007;313:2597–610.
283. Francis SA, Kelly JM, McCormack J, Rogers RA, Jean L, Schneeberger EE, et al. Rapid reduction of MDCK cell cholesterol by methyl- β -cyclodextrin alters steady state transepithelial electrical resistance. *Eur J Cell Biol*. 1999;78:473–84.
284. Lee DBN, Jamgotchian N, Allen SG, Abeles MB, Ward HJ. A lipid-protein hybrid model for tight junction. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2008;295:1601–12.
285. McGuinn KP, Mahoney MG. Lipid rafts and detergent-resistant membranes in epithelial keratinocytes. *Methods in Molecular Biology*. 2014;1195:133–44.
286. Gidwani A, Brown HA, Holowka D, Baird B. Disruption of lipid order by short-chain ceramides correlates with inhibition of phospholipase D and downstream signaling by FcERI. *J Cell Sci*. 2003;116:3177–87.
287. Wang TY, Silvius JR. Different sphingolipids show differential partitioning into sphingolipid/cholesterol-rich domains in lipid bilayers. *Biophys J*. 2000;79:1478–89.
288. Chapman J V., Gouazé-Andersson V, Messner MC, Flowers M, Karimi R, Kester M, et al. Metabolism of short-chain ceramide by human cancer cells-Implications for therapeutic approaches. *Biochem Pharmacol*. 2010;80:308–15.
289. Kwik J, Boyle S, Fooksman D, Margolis L, Sheetz MP, Edidin M. Membrane cholesterol, lateral mobility, and the phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-dependent organization of cell actin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:13964–9.
290. Saslowsky DE, Thiagarajah JR, McCormick BA, Lee JC, Lencer WI. Microbial sphingomyelinase induces RhoA-mediated reorganization of the apical brush border membrane and is protective against invasion. *Mol Biol Cell*. 2016;27:1120–30.
291. Danielsen EM, Hansen GH. Lipid rafts in epithelial brush borders: Atypical membrane microdomains with specialized functions. *Biochim Biophys Acta Biomembr*. 2003;1617:1–9.
292. Oliferenko S, Paiha K, Harder T, Gerke V, Schwärzler C, Schwarz H, et al. Analysis of CD44-containing lipid rafts: Recruitment of annexin II and stabilization by the actin cytoskeleton. *Journal of Cell Biology*. 1999;146:843–54.

293. Shen L, Turner JR. Actin depolymerization disrupts tight junctions via Caveolae-mediated endocytosis. *Mol Biol Cell*. 2005;16:3919–36.
294. Bowie R V., Donatello S, Lyes C, Owens MB, Babina IS, Hudson L, et al. Lipid rafts are disrupted in mildly inflamed intestinal microenvironments without overt disruption of the epithelial barrier. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2012;302:781–93.