



На правах рукописи

Медведева Снежанна Сергеевна

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

1.5.22 – клеточная биология (биологические науки)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Новосибирск – 2025

Работа выполнена в лаборатории моделирования патологий человека Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения РАН и на кафедре цитологии и генетики факультета естественных наук Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», г. Новосибирск.

Научный руководитель: **Кожевникова Елена Николаевна**, кандидат биологических наук, заведующий лабораторией моделирования патологий человека, Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения РАН, г. Новосибирск

Официальные оппоненты: **Воротеляк Екатерина Андреевна**, доктор биологических наук, член-корреспондент Российской академии наук, руководитель лаборатории клеточной биологии, Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, г. Москва
Повещенко Ольга Владимировна, доктор медицинских наук, руководитель лабораторией клеточных технологий, Институт клинической и экспериментальной лимфологии – филиал Института цитологии и генетики Сибирского отделения РАН, г. Новосибирск

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии РАН, г. Санкт-Петербург

Защита состоится: «___» _____ 2026 г. в _____ часов на заседании Диссертационного совета 24.1.239.01 (Д 003.011.01) на базе ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН» в конференц-зале Института по адресу: 630090, г. Новосибирск, проспект ак. Лаврентьева, 10, т. (383) 363-49-06, факс (383) 333-12-78, e-mail: dissov@bionet.nsc.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИЦиГ СО РАН и на сайте Института <https://www.icgbio.ru/blog/2025/08/25/dissertacija-medvedevoj-snezhanny-sergeevny/>

Автореферат разослан «___» _____ 20___ г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук

Т.М. Хлебодарова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Барьерная функция эпителия реализуется за счёт системы межклеточных контактов, регулирующих прохождение метаболитов, макромолекул и ионов между эпителиоцитами. Нарушение функции межклеточных контактов вызывает повышенную проницаемость эпителия, которая сопутствует ряду заболеваний человека, в частности, воспалительным заболеваниям кишечника (ВЗК). ВЗК относятся к многофакторным хроническим патологиям желудочно-кишечного тракта, этиология которых в настоящее время не в полной мере установлена. Дефекты барьерной функции кишечника были показаны и при других патологических состояниях, таких как синдром раздражённого кишечника, ожирение, сердечная недостаточность. Широкий спектр заболеваний, ассоциированных с нарушением барьерной функции кишечника, подчёркивает необходимость дальнейшего изучения механизмов регуляции проницаемости кишечного эпителия.

Описанные патологии человека носят хронический характер, сопровождаются хроническим воспалением и устойчивым нарушением барьерной функции. 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. Опубликованы данные 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. Ранее было показано, что уровень экспрессии генов, кодирующих белки межклеточных контактов, у муцин-дефицитных мышей не отличаются от такового у животных дикого типа (Borisova et. al., 2020). В свете этих данных представляет интерес изучение субклеточной архитектуры кишечного эпителия при хроническом воспалении, с фокусом на роли цитоскелета, в частности, микрофиламентов актина, в поддержании целостности межклеточных контактов.

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

Задачи исследования:

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 под воздействием экзогенных фосфолипидов;
5. Оценить эффект воздействия церамидов и ингибитора церамидсинтаз на организацию F-актина и локализацию белков клаудина-7 и β -катенина в двух моделях хронического воспаления кишечника на мышах.

Научная новизна и практическая ценность. В работе впервые 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. Показано, что нарушение баланса между полимерной и мономерной формами актина ассоциировано с изменением локализации клаудина-7 и β -катенина, что позволяет рассматривать микрофиламенты актина как основополагающую субклеточную структуру, обеспечивающую поддержание межклеточных контактов в эпителии толстой кишки. Проведённое сопоставление двух моделей хронического воспаления *in vivo*: генетической (*Muc2*^{-/-}) и химически индуцированной (приём раствора натриевой соли сульфата декстрана), позволило выявить общие цитологические признаки повышенной проницаемости кишечного барьера. К таковым можно отнести нарушение организации F-актина и локализации белков межклеточных контактов. Результаты сравнительного анализа расширяют понимание универсальных клеточных механизмов, лежащих в основе нарушения целостности кишечного барьера.

В рамках настоящего исследования в эпителии толстой кишки животных с дефицитом белка муцина-2 выявлено обогащение метаболитов, относящихся к фосфо- и сфинголипидам. Кроме того, было обнаружено нарушение регуляции экспрессии генов, ответственных за модуляцию липидного метаболизма и сборки актинового цитоскелета.

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. Это указывает на потенциальную терапевтическую значимость

путей обмена сфинголипидов в регуляции барьерной функции кишечного эпителия. 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:

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. Материалы диссертации были представлены на: 13th International conference on Bioinformatics of Genome Regulation and Structure\Systems Biology «BGRS\SB-2022», 4–8 июля 2022 г., Новосибирск; всероссийской школе-конференции «Коллекции культур клеток человека и животных: современные вызовы и сетевые решения», 22-23 июня 2022 г., Санкт-Петербург; всероссийской конференции «Синтетическая биология и биофармацевтика», 24 - 28 июля 2022 г., Новосибирск; XXIV съезде физиологического общества им. И.П. Павлова, 11-15 сентября 2023 г., Санкт-Петербург; 27-й Пущинской школе-конференции молодых ученых с международным участием «Биология - наука XXI века», 21-24 апреля 2025 г, Пущино; 14th International conference on Bioinformatics of Genome Regulation and Structure\Systems Biology «BGRS\SB-2024», 5–10 августа 2024 г., Новосибирск; XX Международной (XXIX Всероссийской) Пироговской научной медицинской конференции, 20 марта 2025 г. Москва.

Вклад автора. Автором самостоятельно выполнялись работы по иммуногистохимическому и электронно-микроскопическому анализу клеток и тканей (приготовление цитологических препаратов с их последующим непрямым иммунным окрашиванием и визуализацией с помощью конфокального микроскопа и просвечивающей электронной микроскопии, анализ результатов), работы с культивируемыми клетками и тканями (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 исследуемых веществ животным, оценка проницаемости *in vivo*). Вестерн-блот анализ и анализ данных метаболомного профилирования был проведен совместно с Кожевниковой Е. Н. Оценка уровня экспрессии генов методом ОТ-кПЦР проводилась совместно с Поповой Ю. В. Проведение экспериментов по краткосрочному и длительному кормлению животных фосфолипидами осуществлялось автором совместно с Морозовой М. В. и Болдыревой Л. В. Часть экспериментов с органоидами и криптами проводилась 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. Автор благодарен Центру коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов СО РАН (<http://www.bionet.nsc.ru/microscopy>) за предоставленное оборудование.

Структура и объем диссертации. 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.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 3 работы в зарубежных журналах, включенных в базы Scopus и Web of Science, также имеется 8 публикаций тезисов международных конференций.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Обзор литературы включает четыре подраздела и заключение. Рассмотрены основные компоненты защитного барьера кишечника: муциновый, эпителиальный и подэпителиальный слой. Описано строение плотных и адгезивных контактов с акцентом на белках клаудин-7, β -катенин, а также связи межклеточных контактов с микрофиламентами в норме и патологии. В обзоре дана информация о моделях ВЗК на лабораторных животных и известные данные о функциональной целостности эпителиального барьера в них. Отдельный раздел посвящён роли фосфо- и сфинголипидов в развитии повышенной проницаемости эпителия толстой кишки.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве материала для исследования использованы мыши *Muc2^{-/-}* и мыши C57BL/6, употреблявшие натриевую соль сульфата декстрана (DSS). В работе использованы различные цитологические и молекулярно-биологические методы, в том числе иммуногистохимический анализ методом непрямого иммуномечения, конфокальная и электронная микроскопия, функциональные тесты на проницаемость *in vivo* и *in vitro*, вестерн-блот анализ, метаболомное профилирование, анализ экспрессии генов методом ОТ-кПЦР статистическая обработка данных в программной среде R.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

Изучение локализации белков межклеточных контактов в эпителии толстой кишки животных, моделирующих воспалительные заболевания кишечника (ВЗК).

С целью оценки состояния межклеточных контактов в эпителии толстой кишки при хронически индуцированном воспалении был проведен иммуногистохимический анализ распределения белка плотных контактов клаудина-7, белка адгезивных контактов β -катенина и микрофиламентов актина в клетках эпителия толстой кишки животных, моделирующих ВЗК. У мышей *Muc2*^{-/-} было показано нарушение локализации клаудина-7 и β -катенина (Рис.1А, Б), сопровождающееся дестабилизацией F-актина, что согласуется с результатами, опубликованными ранее (Borisova et. al., 2020). Однако общее количество белков β -катенина и клаудина-7 в экстрактах крипт толстой кишки не изменялось у мышей с мутацией в сравнении с животными дикого типа. (Рис.1В и Borisova et. al., 2020). При этом нарушение локализации белка клаудина-7 не наблюдается в органоидах толстой кишки мутантных животных, что указывает на ключевую роль воспалительного микроокружения в регуляции локализации клаудина-7 (Рис.2В).

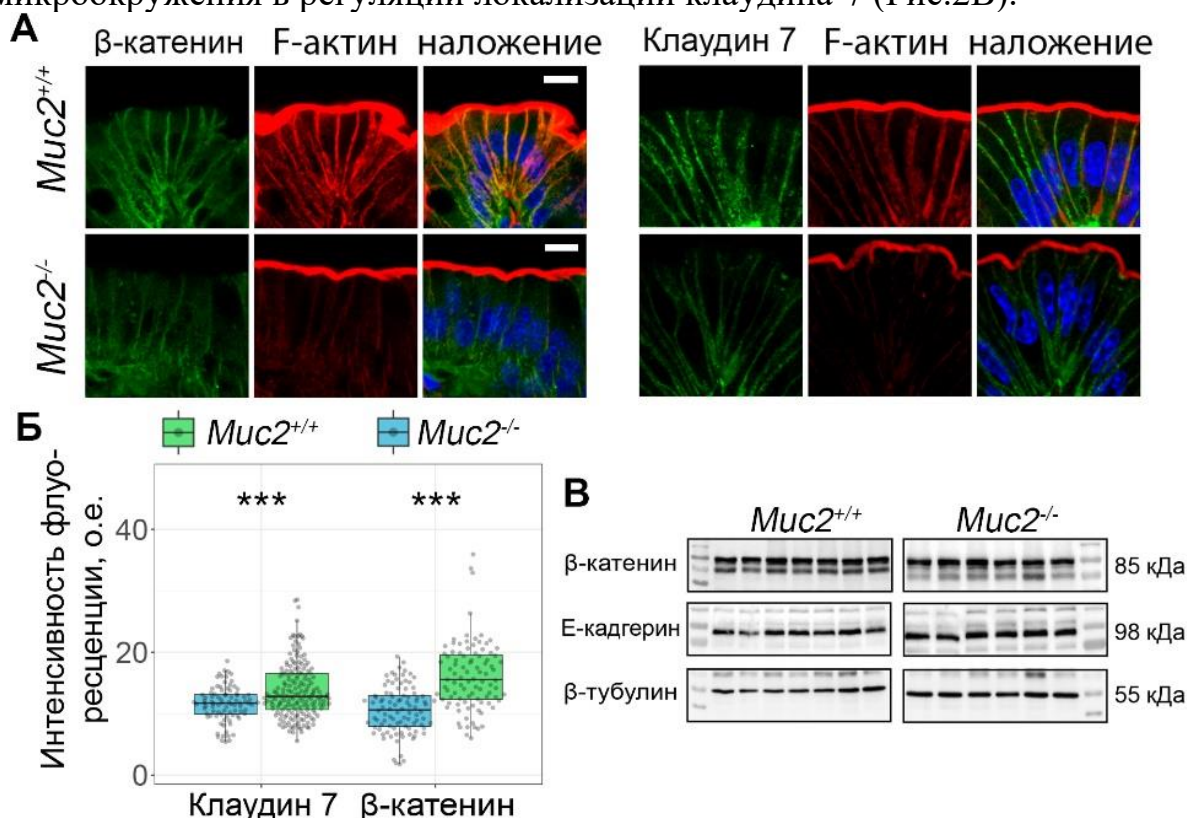


Рисунок 1. Локализация белков межклеточных контактов в энтероцитах толстой кишки животных *Muc2*^{-/-}. **(А)** Иммуногистохимический анализ локализации F-актина (красным) белков клаудин-7 и β -катенин (зелёным) в толстой кишке мышей *Muc2*^{-/-}. Конфокальная микроскопия. Шкала – 10 мкм. **(Б, Д)** Анализ интенсивности флуоресценции белков межклеточных контактов в толстой кишке животных *Muc2*^{-/-}. **(В)** Вестерн-блот-анализ содержания β -катенина и Е-кадгерина в криптах толстой кишки. В качестве контроля загрузки использован белок β -тубулин (***) $p < 0,001$, U -критерий Манна–Уитни с поправкой Бенджамини–Хохберга).

В альтернативной модели хронического колита, вызванного приемом 2% натриевой соли сульфата декстрана (DSS), также наблюдалось нарушение организации актинового цитоскелета и снижение содержания β -катенина и клаудина-7 на латеральных мембранах (Рис.2А, Б). Полученные данные показывают, что нарушение организации микрофиламентов и межклеточных контактов являются общими признаками для двух моделей хронического воспаления кишечника на животных.

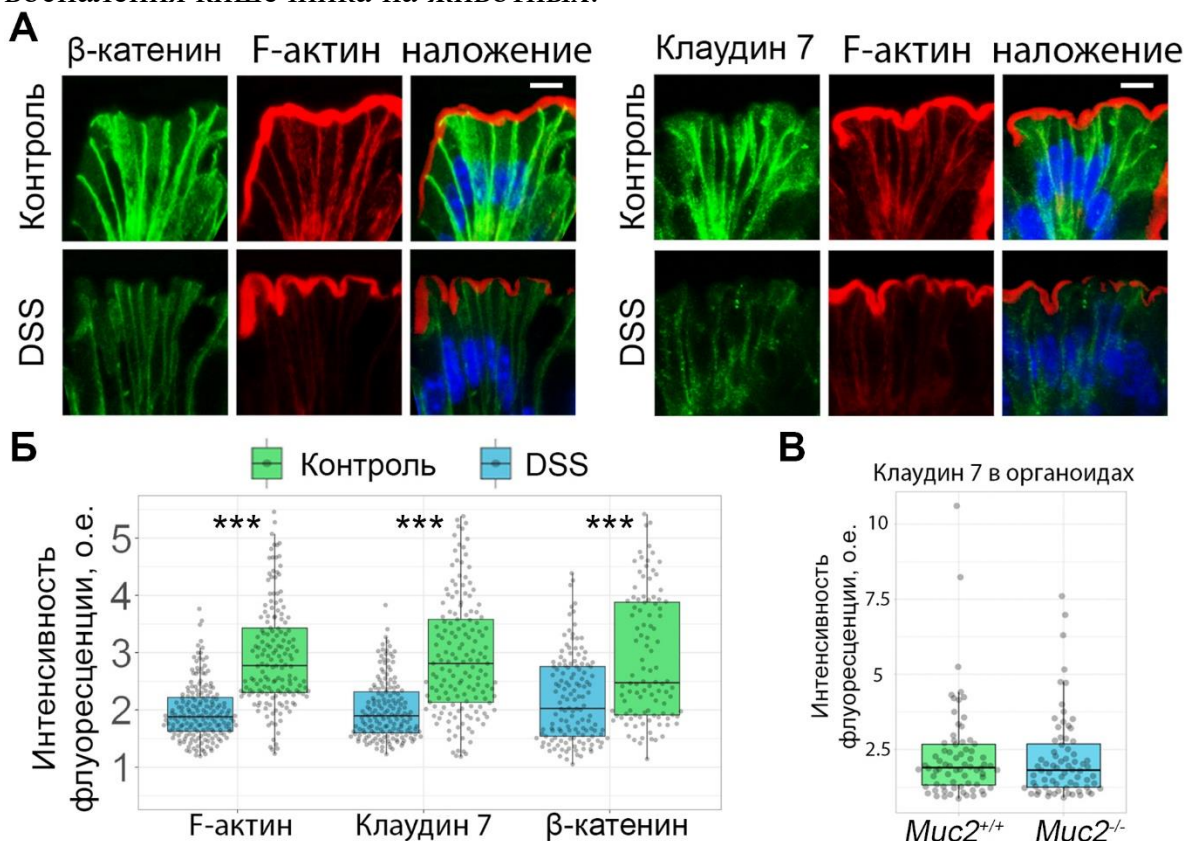


Рисунок 2. Локализация белков межклеточных контактов в энтероцитах толстой кишки мышей с хроническим колитом, вызванным DSS, и органоидов, полученных из толстой кишки животных *Muc2*^{-/-}. **(А)** Иммуногистохимический анализ локализации F-актина (красным) белков клаудин-7 и β -катенин (зелёным) в толстой кишке мышей с хроническим DSS-индуцированным колитом. Конфокальная микроскопия. Шкала – 10 мкм. **(Б)** Анализ интенсивности флуоресценции латерального F-актина и белков межклеточных контактов в толстой кишке мышей с хроническим колитом, вызванным DSS. **(В)** Анализ интенсивности флуоресценции клаудина-7 в органоидах, полученных из мышей *Muc2*^{-/-}. (***) $p < 0,001$, U -критерий Манна–Уитни с поправкой Бенджамини–Хохберга)

Влияние дестабилизации F-актина на структуру и функцию плотных и адгезивных контактов.

Для выявления зависимости структуры и функции межклеточных контактов от состояния актинового цитоскелета в условиях, приближённых к физиологическим, были проведены эксперименты *in vivo* с использованием фармакологических агентов, воздействующих на динамику F-актина. Животным дикого типа ректально вводили на 3 часа латрункулин А – ингибитор полимеризации актина, или джасплакинолид – ингибитор

деполимеризации актина. Иммуногистохимический анализ показал, что оба препарата вызывают достоверные нарушения структуры актинового цитоскелета энтероцитов (Рис.3А, Б). Воздействие джасплакинолида привело к делокализации белков клаудина-7 и β -катенина (Рис.3Б). В то же время латрункулин А способствовал повышению концентрации белков клаудина-7 и β -катенина на латеральных мембранах (Рис.3А). Тем не менее, функциональный тест на проницаемость органоидов, полученных из клеток животных дикого типа, выявил достоверное нарушение барьерной функции эпителия после обработки латрункулином А, и тенденцию к повышению проницаемости после обработки джасплакинолидом (Рис.3В, Г). Эти наблюдения позволяют заключить, что нарушения актинового цитоскелета, независимо от направления смещения его динамического равновесия, сопровождаются изменением локализации белков межклеточных контактов и повышением проницаемости эпителия.

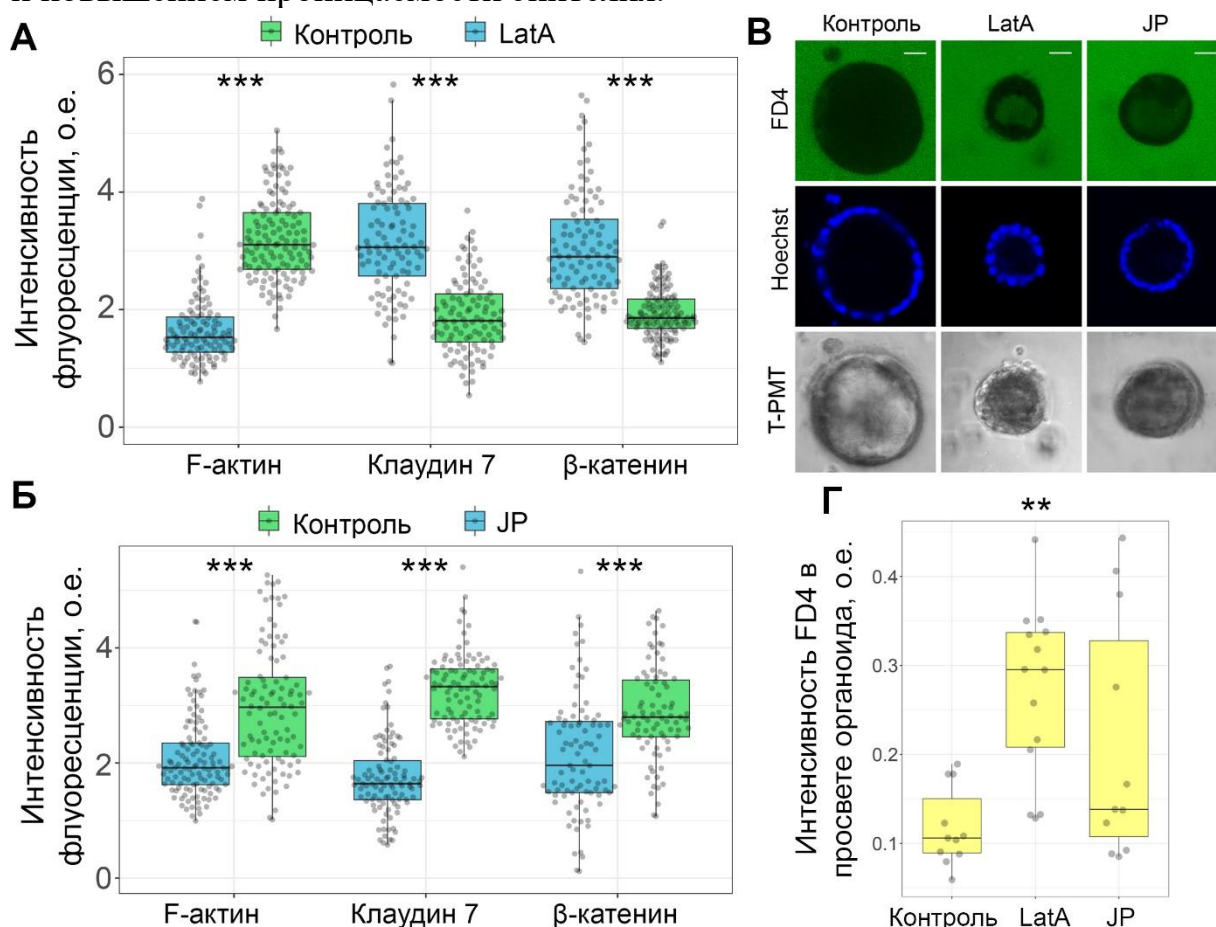


Рисунок 3. Воздействие модуляторов сборки белка F-актина на локализацию и функцию белков межклеточных контактов. (А, Б) Анализ интенсивности флуоресценции латерального F-актина и белков межклеточных контактов после ректального введения латрункулина А (А) и джасплакинолида (Б) (***) $p < 0,001$, U -критерий Манна–Уитни с поправкой Бенджамини–Хохберга). (В) Функциональный тест на проницаемость органоидов при добавлении модуляторов полимеризации актина в культуральную среду. Т-РМТ – режим проходящего света. Конфокальная микроскопия. Шкала – 50 мкм. (Г) Анализ относительной интенсивности флуоресценции 4 кДа FITC-декстрана (FD4) в полости органоидов при добавлении модуляторов актина (** $p < 0,01$, U -критерий Манна–Уитни с поправкой Бенджамини–Хохберга).

Исследование метаболомного профиля и экспрессии генов в эпителии толстой кишки мышей *Muc2*^{-/-}.

В рамках исследования 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 кишки мышей линий *Muc2*^{+/+} и *Muc2*^{-/-}. В эпителии животных с дефицитом белка муцина-2 было выявлено накопление фосфолипидов, таких как фосфатидилхолин, -серин, -этаноламин, -инозитол, -глицерин и сфинголипидов, в частности, церамидов (Рис.4А). Эти изменения могут указывать на нарушение липидного обмена, ассоциированного с хроническим воспалением и повреждением эпителиального барьера.

Изменения в регуляции липидного обмена и организации актинового цитоскелета подтверждаются оценкой изменения экспрессии генов, участвующих в этих процессах. Было выявлено повышение уровня экспрессии генов *CerS3* (церамидсинтаза 3) и *Pla2g2e* (фосфолипаза А), а также снижение экспрессии *Plcb1*, *Plcb4* (фосфолипазы В) и генов *Enah*, *Pfn2* и *Wasf1*, продукты которых участвуют в полимеризации F-актина (Рис.4Б).

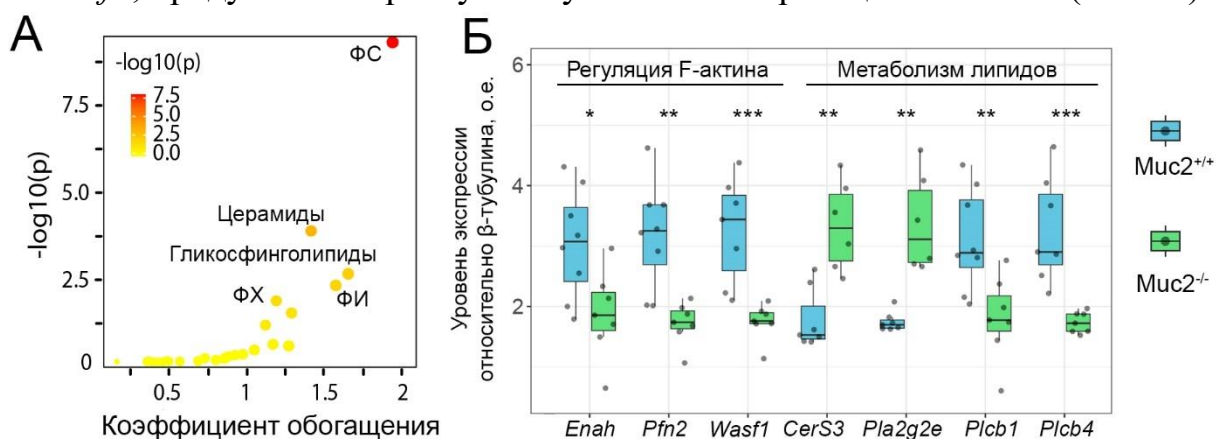


Рисунок 4. Исследование метаболических нарушений и экспрессии генов, участвующих в регуляции липидного метаболизма и перестройке F-актина, в крипах мышей *Muc2*^{+/+} и *Muc2*^{-/-}. (А) Диаграмма обогащения метаболических путей у животных *Muc2*^{-/-}. ФС, ФХ, ФИ – фосфатидилсерин, -холин, -инозитол, соответственно. (Б) Полуколичественный анализ экспрессии генов, вовлечённых в метаболизм липидов и регуляцию полимеризации микрофиламентов (* p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, U-критерий Манна–Уитни).

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

Выявленное в ходе метаболомного анализа накопление фосфолипидов, критически важных для формирования клеточных структур и регуляции сигнальных каскадов, может обуславливать повышенную проницаемость кишечного барьера. Чтобы проверить это предположение, была исследована структура эпителия кишечника животных дикого типа при воздействии

избытка экзогенных фосфолипидов. Морфометрический анализ показал, что диета, богатая фосфолипидами, вызывает слабые изменения толщины просвета плотных и адгезивных контактов и выраженные нарушения внутренней организации митохондрий, такие как снижение количества крист и увеличение размера и числа липидных капель внутри митохондрий (Рис.5А-В, Е-Ж). Анализ проницаемости барьера кишечника *in vivo* не выявил функциональных нарушений (Рис.5Д), однако оценка митохондриального дыхания по протоколу MitoStressTest показала снижение резервной дыхательной ёмкости митохондрий, что может сигнализировать о нарушении работы компонентов дыхательной цепи, в частности комплекса IV (Рис.5Г).

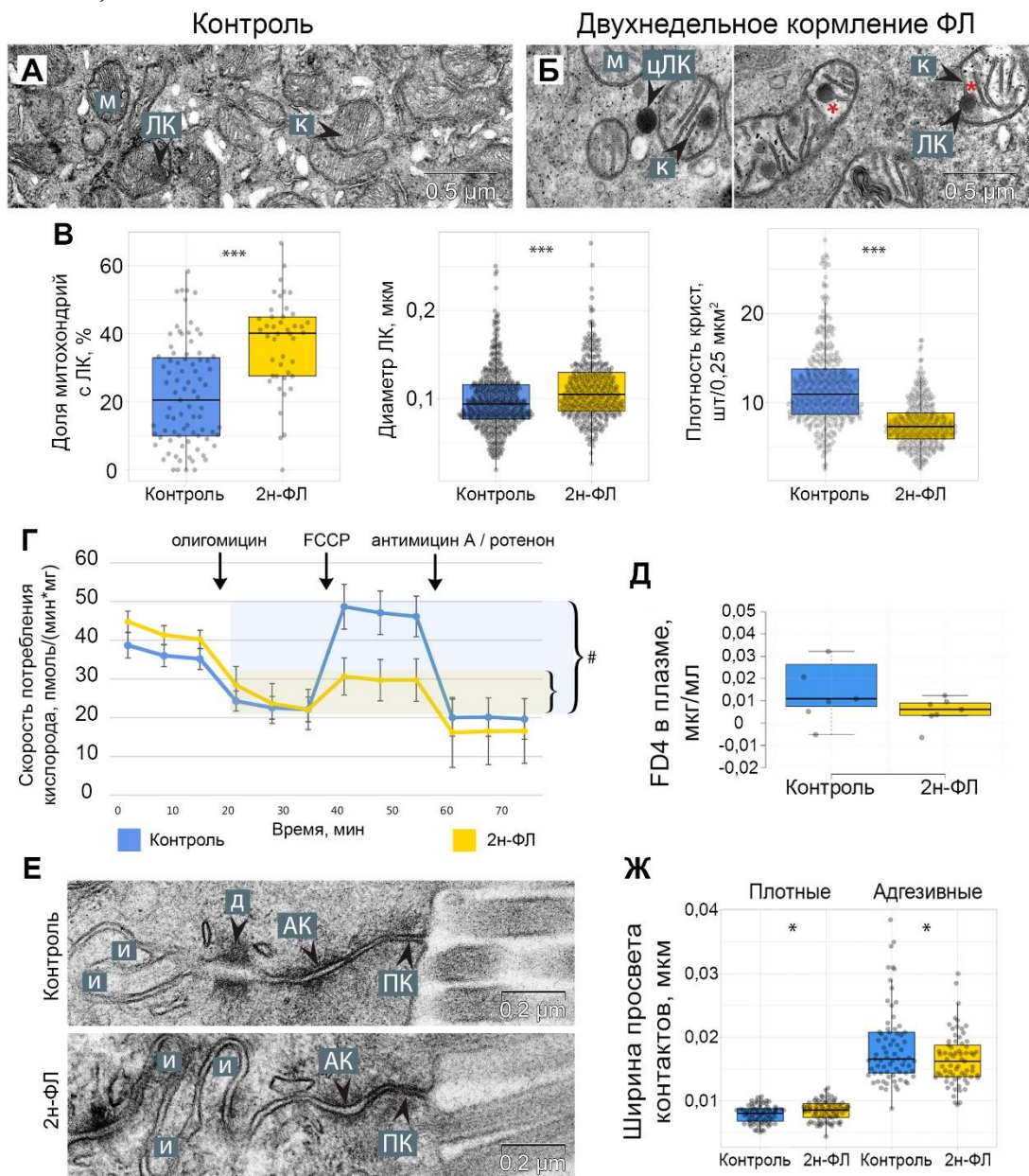


Рисунок 5. Ультраструктурные особенности клеток эпителия толстой кишки на фоне применения двухнедельной диеты, богатой фосфолипидами (2н-ФЛ). (А, Б) Нисходящая толстая кишка мышей после предоставления фосфолипидов. (А) контроль, (Б) мыши из группы 2н-ФЛ. Расширенные кристы отмечены красными звездами. К: кристы; ЛК: липидная капля; цЛК: цитоплазматическая липидная капля; М: митохондрии.

Просвечивающая электронная микроскопия. (В) Морфометрический анализ митохондрий (** $p < 0,001$, t-критерий Стьюдента). (Г) Скорость потребления кислорода, измеренная с помощью анализатора Seahorse XF24 по протоколу Mito Stress Test (# $p < 0,05$, критерий Фридмана). (Д) Оценка кишечной проницаемости *in vivo* с помощью 4 кДа FITC-декстрана (FD4). (Е) Апикальные контакты между энтероцитами. АК: адгезивный контакт; Д: десмосома; И: интердигитации; ПК: плотный контакт. Просвечивающая электронная микроскопия. (Ж) Морфометрический анализ ширины плотных и адгезивных контактов (* $p < 0,05$, t-критерий Стьюдента).

Изучение роли церамидов в поддержании структурной и функциональной целостности барьера толстой кишки

Накопление церамидов в толстой кишке моделировали путём ректального введения мицелл церамида С6 животным дикого типа. Иммуногистохимический анализ выявил, что воздействие церамида сопровождается нарушением организации F-актина и делокализацией белка β -катенина с латеральных мембран энтероцитов. Напротив, белок клаудин-7 имел повышенное содержание в зоне межклеточных контактов.

В противоположном по смыслу экспериментальном подходе мышам *Muc2*^{-/-} ректально вводили ингибитор церамидсинтаз фумонизин В1. Анализ локализации белков показала восстановление структуры F-актина, повышение содержания белка β -катенина и снижение содержания белка клаудина-7 в области межклеточных контактов (Рис.6А-В).

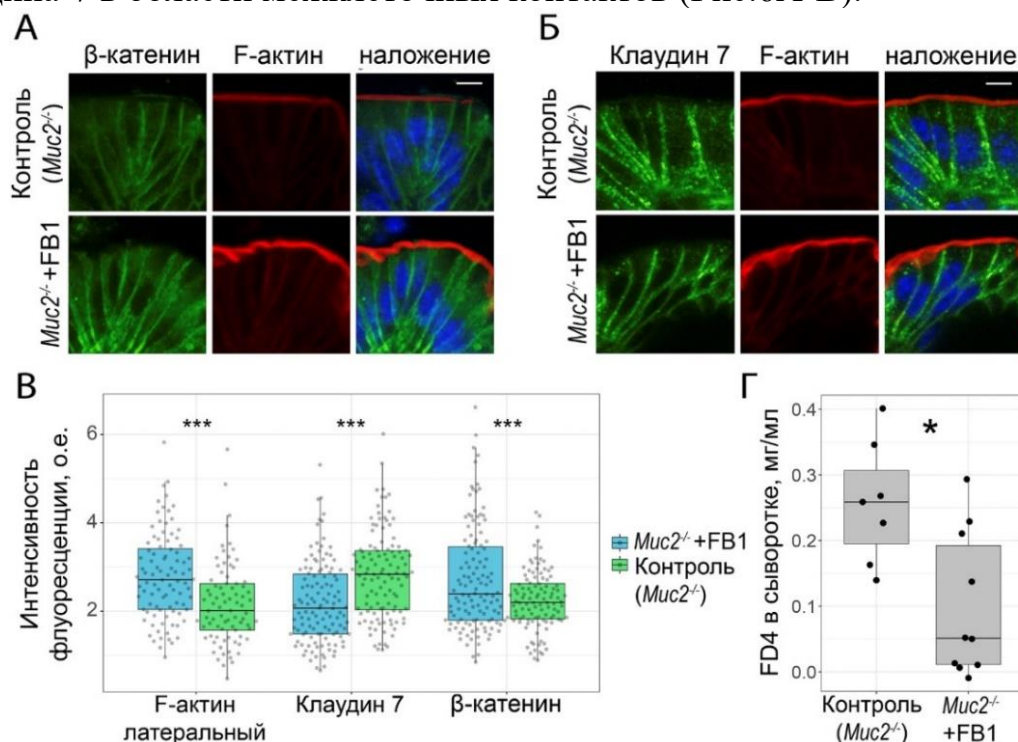


Рисунок 6. Воздействие фумонизина В1 (FB1) на эпителий толстой кишки мышей *Muc2*^{-/-}. (А, Б) Иммуноокрашивание F-актина, белков клаудин-7 и β -катенина в нисходящей толстой кишке мышей *Muc2*^{-/-} через 12 часов после ректального введения фумонизина В1. Конфокальная микроскопия. Шкала – 10 мкм. (В) Анализ интенсивности флуоресценции F-актина, белков клаудина-7 и β -катенина у *Muc2*^{-/-} мышей (** $p < 0,001$, U-критерий Манна-Уитни). (Г) Оценка проницаемости кишечника *in vivo* с помощью FITC-декстрана 4 кДа (FD4) после ректального введения фумонизина животным *Muc2*^{-/-} (* $p < 0,05$, U-критерий Манна-Уитни).

Аналогичный результат был получен при изучении локализации данных белков в модели DSS-индуцированного колита после ректального введения фумонизина B1 (Рис.7). Функциональный тест на проницаемость *in vivo* показал, что ректальное введение фумонизина B1 достоверно снижает содержание FITC-декстрана в плазме крови *Muc2*^{-/-} животных (Рис.6Г). Эти данные свидетельствуют о частичном восстановлении барьерной функции эпителия на фоне ингибирования синтеза церамидов.

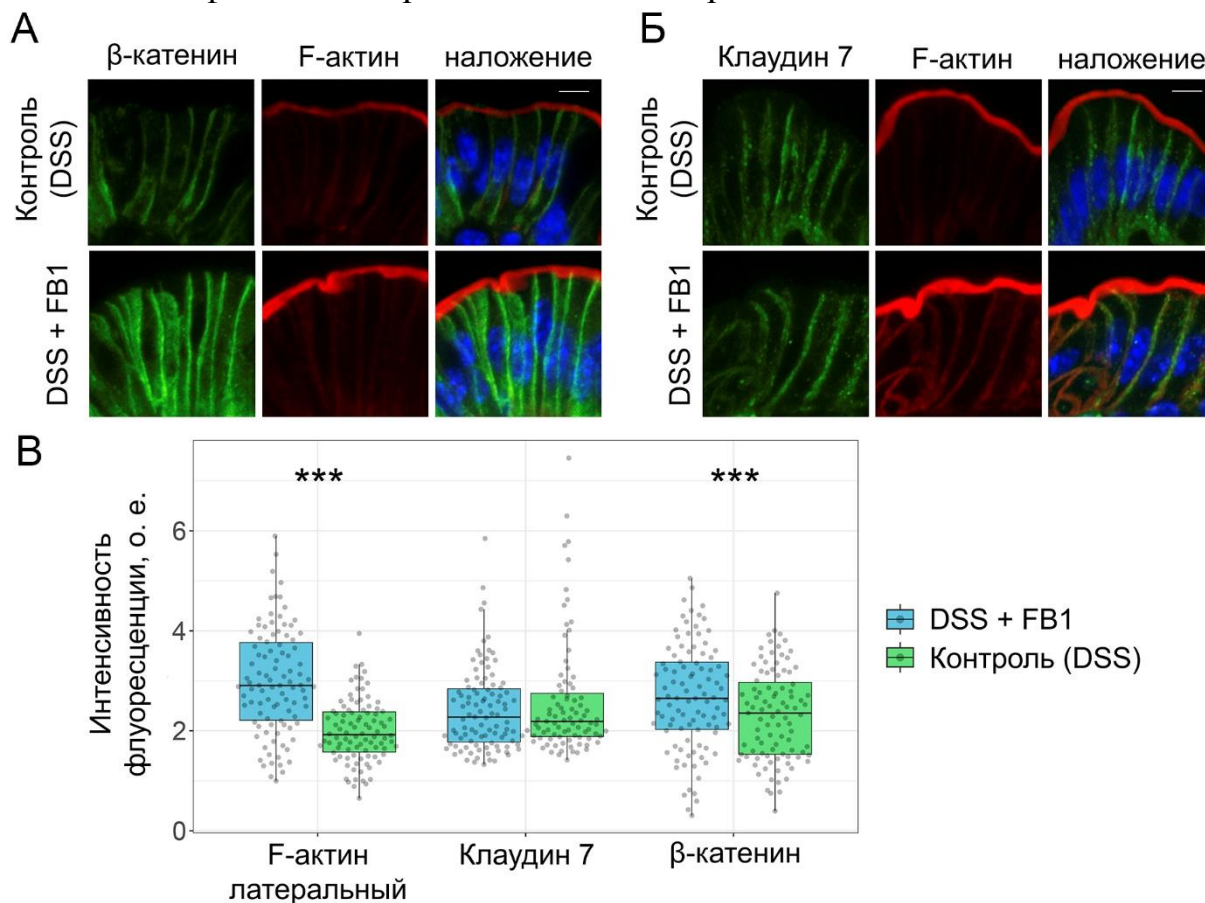


Рисунок 7. Воздействие фумонизина B1 (FB1) на эпителий толстой кишки мышей с хроническим колитом, вызванным DSS. (**А, Б**) Иммуноокрашивание на F-актин, белки клаудин-7 и β-катенин в нисходящей толстой кишке мышей с хроническим DSS-индуцированным воспалением через 12 часов после ректального введения FB1. Конфокальная микроскопия. Шкала – 10 мкм. (**В**) Анализ интенсивности флуоресценции F-актина, белков клаудина-7 и β-катенина в DSS-индуцированной модели колита (*** $p < 0,001$, *U*-критерий Манна-Уитни).

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

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

Результаты, полученные на моделях хронического колита на мышах, согласуются с ранее опубликованными данными. Показано, что у пациентов с ВЗК в состоянии острого воспаления наблюдается снижение представленности белков плотных и адгезивных контактов, тогда как в ремиссии их количества сопоставимы с показателями здоровых тканей

(Gassler et. al., 2001; Kucharzik et. al., 2001; Fragoulis et. al., 2019). Мембранная локализация белков межклеточных контактов при хроническом воспалении меняется, вызывая повышение проницаемости эпителия (Ivanov et. al., 2004; Prasad et. al., 2005). Этот процесс подавляется ингибиторами эндоцитоза, что указывает на роль клатрин-зависимой интернализации плазматических мембран и ассоциированных с ними белков в этом процессе (Ivanov et. al., 2004; Bruewer et. al., 2003). Потеря белка β -катенина из адгезивных контактов не обязательно сопровождается нарушением барьерной функции эпителия (Fevr et. al., 2007), что может говорить о решающей роли взаимодействующего с ним E-кадгерина в дисфункции межклеточных соединений. Исследования функции клаудина-7 дают противоречивые выводы, и его относят к клаудинам со смешанной функцией. Делеция соответствующего гена приводит к повышению проницаемости и симптомам, свойственным ВЗК (Capaldo, 2023; Wang et.al., 2021; Ding et.al., 2012).

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

Результаты экспериментов с воздействием модуляторов актина на эпителий толстой кишки во многом согласуются с наблюдениями на клеточных культурах T84 и Caco2 (Ivanov et. al., 2005; Ramirez-Velez & Belardi, 2023; Song et. al., 2019). Воспалительные цитокины способствуют разрушению актинового цитоскелета в модельных монослоях эпителиальных клеток кишечника (Musch et.al., 2006). Настоящая работа демонстрирует аналогичные нарушения у моделей ВЗК *in vivo*, позволяя предположить, что при хроническом воспалении нарушение организации F-актина в энтероцитах является одним из ключевых факторов, способствующих дестабилизации межклеточных контактов.

Влияние фосфолипидов на эпителиальный барьер кишечника.

Липиды играют важную роль в поддержании гомеостаза слизистой оболочки кишечника. Данная работа впервые продемонстрировала накопление липидных включений и нарушение дыхания в митохондриях энтероцитов толстой кишки на фоне диеты, богатой фосфолипидами. Механизм, по которому липидные капли могли бы проникать внутрь митохондрий или образовываться в пределах этих органелл, на данный момент не описан. Подобные включения могут представлять собой механизм утилизации избыточных или неправильно организованных мембран (Liao et. al., 2019). Нарушение ультраструктуры митохондрий характерно для моделей острого DSS-индуцированного колита и *Muc2^{-/-}* (Borisova et. al., 2020, Kong et. al., 2023; Yeganeh et. al., 2018). Мыши *Muc2^{-/-}* аналогично животным, получавшим корм, обогащенный фосфолипидами, демонстрируют снижение резервной дыхательной ёмкости у митохондрий энтероцитов (Borisova et. al., 2020). Аналогично в DSS-индуцированной модели колита было показано снижение активности комплексов II и IV цепи переноса электронов (Santhanam et. al., 2012). Снижение резервной дыхательной ёмкости зависит

от активности комплекса IV и может способствовать запуску апоптоза или злокачественному преобразованию (Marchetti et. al., 2020). Дисфункция митохондрий характерна для тканей кишечника пациентов с ВЗК и для клеток эпителия кишечника у модельных животных (Novak & Mollen, 2015; Boyarati et. al., 2018). Нарушение протонного градиента митохондрий в культурах клеток приводит к деполимеризации F-актина и дестабилизации межклеточных контактов (Novak & Mollen, 2015; Tsukamoto T, Nigam, 1997; Golenhofen et. al., 1995). Однако в рамках данной работы нарушения функции митохондрий, вызванного фосфолипидной диетой, оказалось недостаточно для дестабилизации межклеточных контактов.

Роль церамидов в регуляции проницаемости клеточного барьера. Структурные и функциональные свойства церамид-содержащих липидных рафтов.

Церамиды, простейшие представители класса сфинголипидов, являются ключевыми медиаторами воспалительного ответа. В ряде моделей ВЗК наблюдается повышенный уровень церамидов в тканях кишечника (Bauer et. al., 2009; Shores et. al., 2011), аналогичные результаты получены на системах *in vitro* (Schilling et. al., 2013) и на материале пациентов с ВЗК (Diab et. al., 2019; Suh et. al., 2018). Анализ экспрессии генов в эпителии толстой кишки животных *Muc2^{-/-}*, проведённый в настоящей работе, позволяет выдвинуть в качестве гена-кандидата, нарушающего баланс церамидов в толстой кишке, ген *CerS3*, кодирующий церамидсинтазу 3. Повышение его экспрессии, предположительно, может повышать уровень церамидов в эпителии и инициировать каскад событий, приводящих к нарушению межклеточных контактов.

Аффинность связывания комплекса актиновых филаментов с миозиновыми моторами и клеточными мембранами зависит от липидного состава последних (Liu et al., 2016). Изменение уровня церамидов, в свою очередь, может оказывать существенное влияние на динамику актинового цитоскелета. Это подтверждается тем, что повышение уровня церамидов наблюдается, в частности, при мутациях в гене *Arc*, которые ассоциированы с нарушением регуляции RhoA и микрофиламентов (Jukes et al., 2021).

Одним из ключевых механизмов такого влияния является способность церамидов формировать высокостабильные липидные микродомены (Kinoshita M, Matsumori et al., 2022). Их избыток приводит к вытеснению холестерина из физиологических «липидных рафтов» (Zhang et al., 2009). Последующая потеря холестерина, в свою очередь, нарушает локализацию белков плотных контактов, вызывает перестройку F-актина и, как следствие, повреждает эпителиальный барьер (Lynch et al., 2007; Lee et al., 2008). Данные о патогенной роли церамидов подтверждаются тем, что их накопление в мембранных фракциях, содержащих белки плотных контактов, повышает проницаемость монослоев клеток Caco-2 и AECII (Bock et al., 2007; Yang et al., 2017).

Важно, что дезорганизация липидных рафтов под действием цитокинов, наблюдаемая в моделях воспаления *in vitro* и *in vivo*, а также в образцах тканей пациентов с ВЗК, происходит до повышения проницаемости эпителиального барьера (Bowie et al., 2012). Это позволяет предположить, что нарушение целостности мембранных микродоменов является не следствием, а скорее отправной точкой в каскаде событий, ведущих к нарушению барьерной функции кишечника.

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 ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ

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. – 2025. – Vol. 13(3) – p. 2423137. (Импакт-фактор SJP: 5,146, индексируется РИНЦ, Scopus, Web of Science) doi: 10.1080/21688370.2024.2423137