

## ФИЗИОЛОГИЯ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ, БИОХИМИЯ, БИОФИЗИКА

УДК 591.425;612.215.5

*Г. Н. Волгин, Е. А. Полякова, А. Г. Марков*

### ИССЛЕДОВАНИЕ БЕЛКОВ ПЛОТНЫХ КОНТАКТОВ В ПЛЕВРЕ ЧЕЛОВЕКА

#### Введение

Плевра представляет собой тонкую, гладкую, богатую эластичными волокнами серозную оболочку легких. Висцеральный и париетальный листки плевры образуют между собой замкнутое пространство — плевральную полость, содержащую небольшое количество жидкости. Объем и состав плевральной жидкости постоянен, что предполагает наличие устойчивого равновесия между количеством жидкости, поступающей в плевральную полость и выводимой из нее. Долгое время полагали, что существует два механизма формирования плевральной жидкости: капиллярная фильтрация и лимфатический дренаж. Первый основан на разности гидростатического и коллоидоосмотического давления между плевральной жидкостью и кровью, второй — на оттоке плевральной жидкости через стомы в лимфатические сосуды [1–3].

Согласно последним данным мезотелиальные клетки, образующие вместе с подлежащей соединительной тканью плевральные листки, также способны активно транспортировать электролиты [4]. Однако их роль в регуляции состава и объема плевральной жидкости остается неясной, поскольку не определены барьерные свойства мезотелия. Исследование активного транспорта веществ через плевру проводили с использованием блокаторов различных ионных каналов и ионных насосов. Опыты с аппликацией фармакологических агентов на поверхность плевры, обращенную в полость (апикальная мембрана мезотелия), или со стороны соединительной ткани (базолатеральная мембрана мезотелия) показали векторность транспортных процессов [5, 6]. Транспорт ионов, молекул веществ и воды через мезотелий происходит по двум путям: трансцеллюлярному и парацеллюлярному. Полагают, что посредством трансцеллюлярного пути с помощью мембранных помп и каналов формируются электрохимические градиенты, которые, в свою очередь, обеспечивают межклеточный транспорт через плотные контакты, расположенные ближе к апикальной мембране мезотелиальных клеток. Плотные контакты также могут вносить свой вклад в формирование электрических и концентрационных градиентов, тем самым обеспечивая векторность транспортных процессов через мезотелий. Для этого они должны создавать препят-

ствие обратному току ионов и молекул веществ, т. е. выполнять функцию барьера и, как следствие, определять барьерные свойства эпителия в целом. Молекулярные компоненты комплекса плотных контактов определены сравнительно недавно. Установлено, что их барьерную функцию обеспечивают окклюдин и белки семейства клаудинов.

По влиянию на проницаемость эпителиального пласта принято делить клаудины на две группы: клаудины, формирующие ионоселективные поры, и клаудины, определяющие его барьерные свойства. К первой группе относится, например, клаудин-2, наличие которого увеличивает проницаемость почечного эпителия для ионов натрия и снижает трансэпителиальное сопротивление [7]. Клаудины-2 и -12 усиливают межклеточную диффузию ионов кальция в эпителии кишки [8]. Ко второй группе клаудинов (клаудины-1, -3, -4, -5, -8, -14, -18 и -19) относятся белки, которые снижают проницаемость эпителия. Изменения в экспрессии клаудинов приводят к нарушению как барьерной функции эпителия, так и его избирательной проницаемости для воды и ионов [9].

Функции белков плотных контактов исследовались в эпителиях разного типа, но их роль в реализации межклеточного транспорта в мезотелии плевры неизвестна. Поэтому целью данной работы было изучение экспрессии белков плотных контактов, являющихся элементом эпителиального барьера, и их возможной роли в формировании плевральной жидкости.

### Материалы и методы исследований

**Методические особенности получения материала.** Ткань плевры была получена от больных ( $n = 16$ ), находящихся на лечении в Центре интенсивной пульмонологии и торакальной хирургии Городской многопрофильной больницы № 2 Санкт-Петербурга. Исследование одобрено Локальным этическим комитетом и проведено с личного согласия пациентов.

Для изучения использовали плевру, полученную в ходе оперативных вмешательств на органах грудной клетки, выполненных по поводу различных заболеваний. В работе использовался удаленный по медицинским показаниям интраоперационный материал, что не приводило к сознательному расширению объема оперативного вмешательства для получения опытных образцов.

В первой серии экспериментов исследовали плевру пациентов, страдающих спонтанным пневмотораксом и оперированных в первые сутки заболевания, у которых отсутствовали местные и системные признаки воспаления (контроль). Во второй серии исследовали плевру больных с воспалительным процессом в плевральной полости, который сопровождался лихорадкой, лейкоцитозом, изменением формулы крови и биохимических показателей, характерных для острого воспаления. Образцы ткани воспаленной висцеральной и париетальной плевры сравнивали с контрольными образцами.

Плевру визуально проверяли на отсутствие повреждений, жировой и опухолевой тканей. После тщательного отделения мезотелия от подлежащей соединительной ткани образцы помещали в преоксигенированный (95%  $O_2$  и 5%  $CO_2$ ) физиологический раствор и доставляли при температуре 4 °С в лабораторию в течение часа.

**Иммунофлуоресцентное окрашивание.** Для проведения иммунофлуоресцентного окрашивания ткань плевры для фиксации помещалась сначала в формалин 4% на 1 ч, затем в фосфатный буфер (PBS) с  $Ca^{2+}$  и  $Mg^{2+}$  (PAA Laboratories GmbH, Германия). После стандартной проводки по спиртам образцы заключались в парафин (Merck, Германия).

Перед иммунофлуоресцентным окрашиванием парафиновые срезы толщиной 4 мкм монтировали на предметные стекла, депарафинировали в серии спиртов убывающей концентрации (ксилол, этанол — 100%, этанол — 96%, этанол — 80%, этанол — 70%), промывали в бидистиллированной воде, фосфатном буфере, а затем кипятили в растворе ЭДТА (1 мМ; рН 8,0) и снова промывали в фосфатном буфере. Для блокирования неспецифического связывания срезы инкубировали 30 мин в фосфатном буфере, содержащем 6% козьей сыворотки и 1% бычьего сывороточного альбумина, при комнатной температуре.

*Окрашивание белков плотных контактов.* В течение 60 мин (37 °С) срезы инкубировали с раствором первичных моноклональных мышинных антител к окклюдину, в разведении 1:200, концентрация 2,5 мкг/мл (Zymed Laboratories, США). Затем срезы ткани промывали блокирующим раствором (2 смены по 5 мин) и для визуализации первичных антител наносили вторичные моноклональные антитела (MoViTec, Германия), в разведении 1:500, используя Alexa Fluor™488 козий антимиошиный иммуноглобулин G (60 мин; 37 °С). Вторичные антитела разводили в блокирующем растворе (6% козьей сыворотки, 1% бычьего сывороточного альбумина). После проведения реакции срезы тщательно отмывали блокирующим раствором, в течение 5 мин проводили окраску ядер DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) в разведении 1:1000. Затем срезы отмывали 100%-ным этанолом и дистиллированной водой и наносили покровные стекла с добавлением небольшого количества ProTaq MountFluor (Biosс, Luckenwalde, Германия).

*Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия.* Препараты изучали и фотографировали с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа LSM 510 META (Zeiss, Jena, Германия) в Институте клинической физиологии Свободного университета Берлина, используя 40-кратное увеличение и возбуждающую длину волны 488. Эмиссия Alexa Fluor™488 происходила в зеленой области спектра. Данные по конфокальной микроскопии обрабатывали с помощью программного обеспечения LSM Image Browser (Carl Zeiss, Германия).

*Изучение экспрессии белков плотных контактов с помощью Вестерн-блот анализа. Выделение мембранных белков из ткани.* При подготовке проб белка для Вестерн-блот анализа ткань помещали в стеклянную колбу, добавив 1 мл стандартного лизирующего буфера для мембранных белков с ингибитором протеаз Complete (Boehringer, Mannheim, Германия), и растирали до гомогенного состояния. Полученный лизат помещали в пробирки и прокачивали с помощью шприцов с различными диаметрами игл для получения максимально гомогенного раствора, центрифугировали в течение 5 мин при 200 g (4 °С) для разделения фракций белков мембраны и цитоплазмы клеток. Растворимую фракцию, содержащую мембранные белки, помещали в новые эпендорфы и центрифугировали при 43 000 g (4 °С) в течение 30 мин. К осажденной фракции добавляли 100 мкл охлажденного TRIS-буфера (20 мМ Tris, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мМ EDTA, 0,3 мМ EGTA), прокачивали несколько раз через инсулиновый шприц до полного растворения осадка.

*Количественное определение белка.* Для определения количества всех мембранных белков, содержащихся в растворе, по стандартному протоколу заполнялся планшет, где в качестве контроля помещались бидистиллированная вода, лизирующий буфер и растворы с содержанием белка 0,2, 0,8 и 1,2 мкг/мкл, относительно которых измерялась концентрация мембранных белков в исследуемых пробах. После заполнения соответствующих ячеек планшет на 30 мин помещали в термостат (37 °С), затем

охлаждали до комнатной температуры. В спектрофотометре (Tecan Spectra, Австрия) при облучении лучами с длиной волны 562 нм автоматически определялась концентрация мембранных белков в исследуемой пробе. На основе полученных данных рассчитывался объем раствора мембранных белков, необходимый для электрофореза в полиакриламидном геле.

*Электрофорез в полиакриламидном геле.* Перед вертикальным электрофорезом аликвоты мембранных белков (5 мкг) с добавлением лизирующего буфера и SDS-буфера Laemmli (Sigma, США) нагревали в течение 5 мин при температуре 95 °С. В полиакриламидный гель с содержанием SDS 12,5% помещались пробы исследуемых растворов мембранных белков в объеме 25 мкл. Гели, содержащие пробы и маркеры BenchMark™ Prestained Protein Ladder (Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe, Германия), в камерах попарно помещались в буферный раствор для электрофореза. Затем в течение 90 мин через гели пропускали электрический ток напряжением 100 В.

*Электроперенос белков на мембрану.* Гели с вертикально распределенными в соответствии с массой белками клеточной мембраны помещают в буфер для электропереноса на мембрану. PVDF (polyvinylidene difluorid) мембраны (PolyScreen, Perkin Elmer Life Sciences, Германия) предварительно обрабатывают 100%-ным этанолом в течение 5 мин. Под воздействием электрического тока с постоянным напряжением 100 В белки в течение 60 мин с геля переносятся на гидрофобную мембрану.

*Иммунодетекция белков плотных контактов.* Для идентификации осажденных белков плотных контактов гидрофобную мембрану 5 мин промывают в растворе PBST (95,5% PBS, 0,5% Tween 20). Затем блокируют неспецифическое связывание в блокирующем растворе (PBS, Tween, 5% BSA, 0,02% NaAzid) в течение 2 ч при комнатной температуре. Инкубируют с первичными антителами (Zymed Laboratories, США) в течение 2 ч при комнатной температуре: к маркеру плотных контактов — белку окклюдину (1:2000), клаудину-2 (1:1000), клаудинам-1, -7 (1:2000), клаудинам-3, -5 (1:5000). Затем мембраны дважды по 10 мин промывают в PBST, один раз в TBST в течение 10 мин и час инкубируют со вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена (разведение в TBST в концентрации 1:2000) (MoBiTec, Германия). После того как мембраны на 5 мин помещали в раствор Lumi-Light<sup>PLUS</sup> (Roche Diagnostics, Германия) для визуализации белков, проводили хемилюминесцентное определение белков плотных контактов. Детекцию и идентификацию белков проводили в анализаторе изображений LAS-1000 (Fujifilm, Япония).

Учитывая, что окрашивание полос определяется количеством белка в пробе, количественный анализ образцов был выполнен после нормирования полученных данных по β-актину. Интенсивность метки β-актина отражает общее количество белка в пробе. Соотнесение силы сигнала исследуемого белка к силе сигнала, полученного для β-актина, позволяет определить истинный уровень интенсивности метки. Для этого мембраны дважды опускали в кипящую бидистиллированную воду на 5 мин для удаления антител и снова повторяли процедуру иммунодетекции, используя при этом первичные антитела к β-актину (1:5000). Для каждого опыта определяли плотность β-актина как внутреннего контроля.

*Денситометрия.* Для сравнения интенсивности сигналов всех клаудинов, экспрессия которых была обнаружена, использовался метод денситометрии. Сравнительный анализ проводился с помощью программного обеспечения AIDA Raytest, 2.5 (Straubenhardt, Германия).

**Регистрация электрофизиологических показателей.** После предварительной подготовки образцы ткани помещали в камеры Уссинга, устройство и принцип работы которых был описан ранее [10]. Перед каждым экспериментом камеру заполняли раствором (20 мл), который омывал препарат с обеих сторон. Раствор содержал (в ммоль/л):  $\text{Na}^+$  — 140,0;  $\text{Cl}^-$  — 123,8;  $\text{K}^+$  — 5,4;  $\text{Ca}^{2+}$  — 1,2;  $\text{Mg}^{2+}$  — 1,2;  $\text{HPO}_4^{2-}$  — 2,4;  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  — 0,6;  $\text{HCO}_3^-$  — 21,0. Раствор в ходе всего эксперимента аэрировался смесью газов, состоящей на 95% из  $\text{O}_2$  и 5% из  $\text{CO}_2$  при температуре 37°C и pH 7,4. Площадь изучаемого участка ткани в камере Уссинга составляла 0,126 см<sup>2</sup>. Для измерения трансэпителиального сопротивления использовали преусилитель (модель EVC-3, World Precision Instruments, США) и аппарат фиксации потенциала (модель EVC-4000, World Precision Instruments, США).

**Гистологическое исследование.** Ткань плевры фиксировали в 3%-ном формалине на 1 ч. После стандартной проводки по спиртам образцы заключались в парафин. Срезы монтировали на предметные стекла, депарафинировали и окрашивали гематоксилином и эозином по стандартному протоколу.

**Статистическая обработка результатов.** Статистический анализ результатов проводили с помощью непараметрического критерия Манна—Уитни с использованием пакета компьютерных программ STATISTICA (версия 6.0). Статистические решения принимались на 5%-ном уровне значимости при двусторонней альтернативе.

### Результаты исследований и их обсуждение

Окклюдин является первым мембранным белком, который был обнаружен в стрендах плотных контактов [11]. В ряде исследований он рассматривался как основной маркер наличия этих межклеточных образований [7, 12, 13]. Поэтому, прежде всего, с помощью иммуногистохимического окрашивания с последующим анализом изображений на конфокальном лазерном микроскопе в висцеральной и париетальной плевре исследовали локализацию этого белка. Он был обнаружен на срезах ткани висцеральной плевры. Окклюдин располагается по периметру клетки в виде изогнутой линии. Поскольку ранее его экспрессия в клетках мезотелия не была показана, полученные результаты сопоставляли с уже известными из литературы гистологическими данными о размере клеток мезотелия плевры человека. Установлено, что их продольный размер варьирует от 12 до 16 мкм [14]. При определении расстояния между линиями свечения окклюдина были обнаружены сходные результаты. А именно в продольном направлении, расстояние между линиями составляло около 12 мкм, в поперечном — от 5 до 8 мкм. На срезах париетальной плевры окклюдин не был выявлен.

Результаты проведенного исследования в сочетании с данными электронной микроскопии [15] позволяют сделать вывод о том, что в мезотелии плевры существуют плотные контакты как часть межклеточного апикального комплекса. Однако согласно полученным нами данным окклюдин находится в составе плотных контактов клеток мезотелия висцеральной плевры и отсутствует в таковых париетальной плевры. Существует два возможных объяснения этому факту. Во-первых, несмотря на общепризнанное представление о том, что окклюдин является маркером плотных контактов, он в определенных условиях или тканях может не участвовать в формировании их белковых цепей. Эмбриональные стволовые клетки, неспособные к экспрессии окклюдина, образуют морфологически нормальные плотные контакты [16]. Более того, мыши,

у которых вовсе отсутствовал окклюдин, не имели нарушений структуры и барьерных функций кишечного эпителия, печени и почек. Однако в ходе постнатального развития у этих животных развивалась стерильность, а также воспаление и гиперплазия слизистой желудка, что позволяет предполагать наличие у окклюдина специфических функций [17]. Во-вторых, можно предположить, что этот белок присутствует в париетальной плевре в очень небольшом количестве и для его идентификации необходимо увеличить количество белка в пробах. Тем не менее наличие окклюдина в висцеральной и его отсутствие в париетальной плевре (при одинаковых условиях проведения эксперимента) подчеркивает различие между ними.

Гистологическое исследование мезотелия показало существование различий в форме клеток париетальной и висцеральной плевры человека. На срезах париетальной плевры мезотелий выглядит как слой вытянутых, уплощенных клеток. На препаратах висцеральной плевры мезотелий имеет кубическую форму и менее регулярную структуру клеточного слоя, что соответствует результатам, полученным другими исследователями на животных [18–20].

С целью подтверждения полученных данных, касающихся неоднородности серозной оболочки легких, проведены электрофизиологические исследования мезотелиальной ткани. В камере Уссинга зарегистрирован трансмезотелиальный потенциал в различных областях плевры. Поверхность плевры, обращенная в плевральную полость (апикальная мембрана клеток мезотелия), была заряжена отрицательно по отношению к поверхности плевры, контактирующей с интерстициальной жидкостью (базолатеральная мембрана). Максимальное значение трансмезотелиальной разности потенциалов ( $1,6 \pm 0,4$  мВ) ( $n = 3$ ) было зарегистрировано в висцеральной плевре. В апикальной области париетальной плевры разность потенциалов составляла  $0,6 \pm 0,2$  мВ, а в каудальной части —  $1,3 \pm 0,4$  мВ (рис. 1). Однако следует отметить, что различия между этими величинами не являются статистически достоверными. Одновременно производили расчет трансмезотелиального сопротивления висцеральной и париетальной плевры, который позволил охарактеризовать их барьерные свойства. В каудальной области париетальной плевры сопротивление составляло  $12,9 \pm 0,8$  Ом·см<sup>2</sup>, что достоверно меньше ( $p < 0,01$ ) сопротивления апикального участка —  $17,9 \pm 1,3$  Ом·см<sup>2</sup> ( $n = 10$ ). Сопротивление висцеральной плевры было равно  $14,8 \pm 1,8$  Ом·см<sup>2</sup> и не отличалось от такового обоих участков париетальной плевры (рис. 2). Различия в электрофизиологических характеристиках апикального и каудального участков париетальной плевры были показаны и в работах других исследователей [21].

Полученные данные свидетельствуют о различии барьерных свойств на разных участках мезотелиальной ткани, образующей серозную оболочку легких, и, как

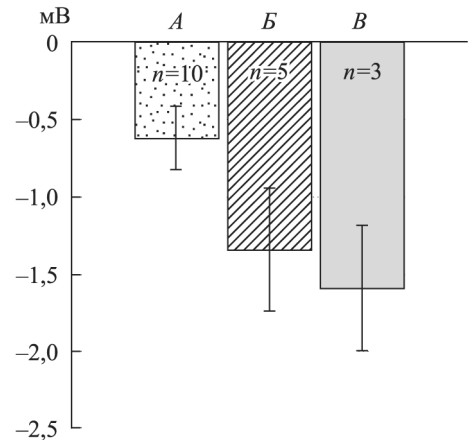


Рис. 1. Трансмезотелиальная разность потенциалов в трех исследованных областях плевры человека (мВ):

А — апикальная часть париетальной плевры, Б — каудальная часть париетальной плевры, В — висцеральная плевра (то же для рис. 2).

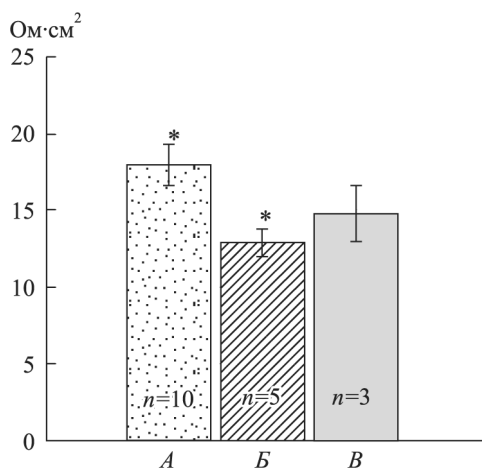


Рис. 2. Трансмезотелиальное сопротивление трех исследованных областей плевры человека (Ом·см<sup>2</sup>)

\* Достоверное различие между группами ( $p < 0,01$ ).

Клаудин-1 рассматривают как один из главных белков плотных контактов, обеспечивающих барьерную функцию эпителиальных тканей.

Напротив, клаудин-2 формирует в парацеллюлярных контактах поры, через которые могут проходить только малые катионы [7]. Недавно было показано, что клаудин-2 также обеспечивает беспрепятственное перемещение воды через межклеточное пространство [23].

Несмотря на присутствие клаудина-3 во многих эпителиях, включая кишечный [24] и почечный [25], а также эндотелий [26], подробная информация, касающаяся его

следствие, о возможных особенностях трансмезотелиального транспорта ионов в разных регионах плевры.

Большое значение для реализации барьерной функции различных эпителиев имеют белки семейства клаудинов, которые так же, как окклюдин являются структурными элементами межклеточных плотных контактов. В ткани плевры впервые были обнаружены клаудины -1, -2, -3, -5 и -7 (рис. 3, 4). Следует отметить, что белки этого семейства отличаются по своему влиянию на проницаемость эпителиального пласта.

По данным литературы клаудин-1-дефицитные мыши погибают в течение нескольких часов после рождения от потери воды организмом. Животные сильно теряют в весе вследствие испарения воды через кожные покровы [22]. Таким образом, кла-

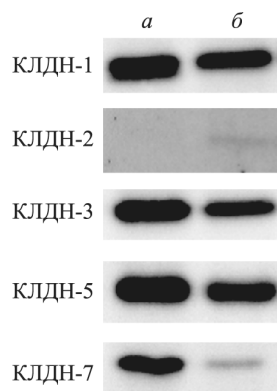
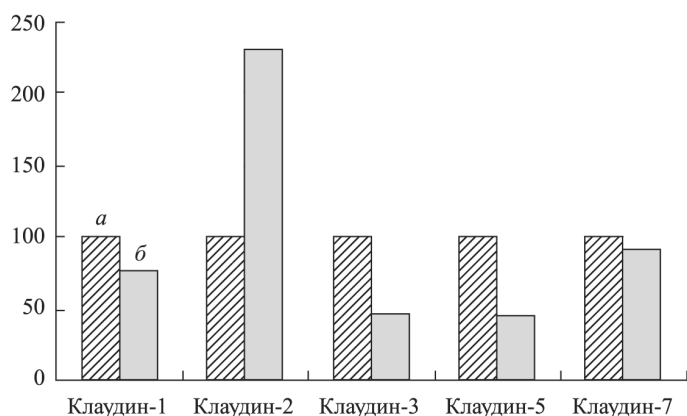


Рис. 3. Изменение уровня экспрессии клаудинов в висцеральной плевре при воспалении: а — контрольная ткань, б — плевра при воспалении. Справа — оригинальный Вестерн-блот (КЛДН — клаудин, число обозначает порядковый номер клаудина). Уровень экспрессии в контрольной ткани принят за 100% (то же для рис. 4).

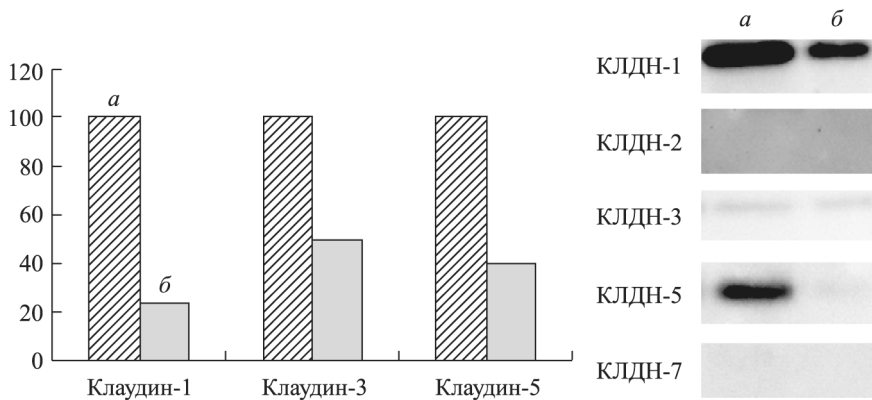


Рис. 4. Изменение уровня экспрессии клаудинов в париетальной плевре при воспалении

вовлеченности в обеспечение барьерной функции, была получена лишь недавно [27]. Показано, что этот белок препятствует прохождению через межклеточные контакты ионов и макромолекул.

Другой белок плотных контактов — клаудин-5 также снижает проницаемость эпителиев [12, 28]. Совместная экспрессия клаудинов-1, -3 и -5 увеличивает трансэпителиальное сопротивление и усиливает барьерные свойства [29].

В отличие от достаточно хорошо изученной в этом плане комбинации клаудинов-1, -2, -3 и -5 барьерные свойства клаудина-7 до сих пор малопонятны. Данные, полученные разными исследователями, носят противоречивый характер. Полагают, что свойства этого белка варьируют в зависимости от типа клеток [30, 31].

Для подтверждения функциональной значимости транспорта через плотные контакты в данном исследовании использовались сведения о том, что при воспалении ткани происходит изменение экспрессии ранее перечисленных белков плотных контактов. Повышение числа провоспалительных цитокинов, согласно литературным данным, ведет к уменьшению количества клаудинов, обеспечивающих усиление барьерных свойств эпителия [32]. Одновременно возрастает экспрессия белков, увеличивающих его проницаемость, например, клаудина-2 [33]. Установлено, что при воспалительном процессе, развивающемся в кишке при болезни Крона и язвенном колите, нарушается экспрессия белков плотных контактов, и это нарушение считается важнейшей причиной прогрессирующей патологии [9, 34, 35]. В проведенных опытах была обнаружена аналогичная тенденция (см. рис. 3, 4). При воспалении в париетальной и висцеральной плевре снижалась экспрессия клаудинов-1, -3, -5. В то же время в висцеральной плевре уровень экспрессии клаудина-2 повышался почти в два раза. Следует отметить, что уровень экспрессии клаудина-7 в висцеральной плевре не изменился (см. рис. 3). Таким образом, в воспаленной плевре было обнаружено общее снижение уплотняющих белков межклеточных контактов и увеличение количества увеличивающих проницаемость эпителия белков.

Особого внимания заслуживает сопоставление результатов Вестерн-блот анализа разных участков плевры, что позволило обнаружить в них отличия в экспрессии клаудинов. В проведенных опытах клаудин-2 был выявлен в апикальной части париетальной плевры, а клаудин-5 — в каудальной части париетальной плевры и в висцеральной



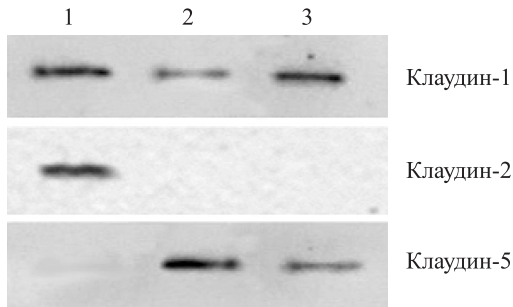


Рис. 5. Экспрессия клаудинов в трех областях плевры человека:

1 — апикальная париетальная плевра; 2 — каудальная париетальная плевра; 3 — висцеральная плевра.

в всех участках плевры, хотя интенсивность сигнала, отражающая его количество, различалась.

Следует отметить, что в данной работе впервые была показана экспрессия в плевре белков плотных контактов, способных формировать ионные поры (клаудины-2, -7), тем самым увеличивая проницаемость мезотелиальной ткани, а также белков, препятствующих движению ионов и молекул веществ через межклеточные пространства (клаудины-1, -3, -5). Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о вкладе плотных контактов в обеспечение барьерных свойств мезотелия плевры и позволяют предположить, что именно эти свойства мезотелия как париетальной, так и висцеральной плевры могут обеспечивать формирование и определять состав плевральной жидкости. Однако различные уровни экспрессии окклюдина и обнаруженных клаудинов в здоровой плевре и при воспалении отражают различную степень их функционального вклада в этот процесс.

Важным результатом проведенного исследования является подтверждение функциональной гетерогенности различных участков плевры. На это указывают данные о неоднородности распределения окклюдина и клаудинов в мезотелиальной ткани, результаты ее гистологического исследования, а также обнаруженные в электрофизиологическом эксперименте достоверные различия в значениях трансмезотелиального сопротивления каудального и апикального участков париетальной плевры. Таким образом, есть основания полагать, что в мезотелии плевры существуют региональные отличия межклеточного транспорта.

\* \* \*

Работа выполнена при поддержке НИР СПбГУ № 1.37.118.2011.

## Литература

1. Wang N. S. Anatomy of the pleura // Clin. Chest Med. 1998. Vol. 19. P. 229–240.
2. Wang N. S. The preformed stomas connecting the pleural cavity and the lymphatics in the parietal pleura // Am. Rev. Respir. Dis. 1975. Vol. 111, N 1. P. 12–20.
3. Albertine K. H., Wiener-Kronish J. P., Staub N. C. The structure of the parietal pleura and its relationship to pleural liquid dynamics in sheep // Anat. Rec. 1984. Vol. 208, N 3. P. 401–409.

4. Zocchi I. Physiology and pathophysiology of pleural fluid turnover // *Eur. Respir. J.* 2002. Vol. 20. P.1545–1558.
5. Zocchi L., Agostoni E., Cremaschi D. Electrolyte transport across the pleura of rabbits // *Respir. Physiol.* 1991. Vol. 86. P.125–138.
6. Hatzoglou C.H., Gourgoulianis K.I., Molyvdas P.A. Effects of SNP, ouabain, and amiloride on electrical potential profile of isolated sheep pleura // *J. Appl. Physiol.* 2001. Vol. 90. P.1565–1569.
7. Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells / Amasheh S., Meiri N., Gitter A.H., Schoneberg T., Mankertz J., Schulzke J.D., Fromm M. // *J. Cell Sci.* 2002. Vol. 115, Pt. 24. P.4969–4976.
8. Chiba H., Osanai M., Murata M. Transmembrane proteins of tight junctions // *Biochimica et Biophysica Acta.* 2008. Vol. 1778. P.588–600.
9. Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease / Zeissig S., Burgel N., Gunzel D., Richter J., Mankertz J., Wahnschaffe U., Kroesen A.J., Zeitz M., Fromm M., Schulzke J.D. // *Gut.* 2007. Vol. 56, N 1. P.61–72.
10. Fromm M., Schulzke J.D., Hegel U. Epithelial and subepithelial contributions to transmural electrical resistance of intact rat jejunum, *in vitro* // *Pflugers Arch.* 1985. Vol. 405. P.400–402.
11. Occludin: a novel integral membrane protein at tight junctions / Furuse M., Hirase T., Itoh M., Nagafuchi A., Yonemura S., Tsukita S., Tsukita S. // *J. Cell Biol.* 1993. Vol. 123. P.1777–1788.
12. Amasheh S., Schmidt T., Mahn M. Contribution of claudin-5 to barrier properties in tight junctions of epithelial cells // *Cell Tissue Res.* 2005. Vol. 321. P.89–96.
13. Inflamed pouch mucosa possesses altered tight junctions indicating recurrence of inflammatory bowel disease / Amasheh S., Dullat S., Fromm M., Schulzke J.D., Buhr H.J., Kroesen A.J. // *Int. J. Colorectal. Dis.* 2009. Vol. 24, N 10. P.1149–1156.
14. Mariassy A.T., Wheeldon E.B. The pleura: a combined light microscopic, scanning, and transmission electron microscopic study in the sheep. I. Normal pleura // *Exper. Lung Res.* 1983. Vol. 4, N 4. P.293–314.
15. Michailova K.N. Electronmicroscopic observations on the visceral and parietal rat's pleura after contralateral pneumonectomy // *Europ. J. Morphol.* 2001. Vol. 39, N 1. P.47–56.
16. Occludin-deficient embryonic stem cells can differentiate into polarized epithelial cells bearing tight junctions / Saitou M., Fujimoto K., Doi Y., Itoh M., Fujimoto T., Furuse M., Takano H., Noda T., Tsukita S. // *J. Cell Biol.* 1998. Vol. 141. P.397–408.
17. Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands / Saitou M., Furuse M., Sasaki H., Schulzke J.D., Fromm M., Takano H., Noda T., Tsukita S. // *Mol. Biol. Cell.* 2005. Vol. 11. P.4131–4142.
18. Michailova K.N. Ultrastructural observations on the human visceral pleura // *Eur. J. Morphol.* 1997. Vol. 35, N 2. P.125–135.
19. Comparison of the electrophysiological properties of the sheep isolated costal and diaphragmatic parietal pleura / Zorogiannis S., Hatzoglou C., Stefanidis I., Ioannou M., Paraskeva E., Gourgoulianis K., Molyvdas P.A. // *Clin. Exper. Pharmacol. Physiol.* 2007. Vol. 34. P.129–131.
20. Ji H.-L., Nie H.-G. Electrolyte and fluid transport in mesothelial cells // *J. Epithel. Biol. Pharmacol.* 2008. Vol. 1. P.1–7.
21. Kouritas V.K., Hatzoglou C., Foroulis C.N., Gourgoulianis K.I. Human parietal pleura present electrophysiology variations according to location in pleural cavity // *Interact. Cardio Vasc. Thorac. Surg.* Vol. 7. P.544–547.
22. Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice / Furuse P.A., Hata M., Furuse K., Yoshida Y., Haratake A., Sugitani Y., Noda T., Kubo A., Tsukita S. // *J. Cell Biol.* 2002. Vol. 156. P.1099–1111.
23. Claudin-2, a component of the tight junction, forms a paracellular water channel / Rosenthal R., Milatz S., Krug S.M., Oelrich B., Schulzke J.D., Amasheh S., Günzel D., Fromm M. // *J. Cell Sci.* 2010. Vol. 123, Pt. 11. P.1913–1921.

24. Segmental expression of claudin proteins correlates with tight junctions barrier properties in rat intestine / Markov A.G., Veshnyakova A., Fromm M., Amasheh M., Amasheh S. // *J. Comp. Physiol.* 2010. Vol. 180, N 4. P. 591–598.
25. Differential expression patterns of claudins, tight junction membrane proteins, in mouse nephron segments / Kiuchi-Saishin Y., Gotoh S., Furuse M., Takasuga A., Tano Y., Tsukita S. // *J. Am. Soc. Nephrol.* 2002. Vol. 13, N 4. P. 875–886.
26. Localization of claudin-3 in tight junctions of the blood-brain barrier in selectively lost during experimental autoimmune encephalomyelitis and human glioblastoma multiforme / Wolburg H., Wolburg-Buchholz K., Rasher-Eggstein G., Liebner S., Hamm S., Duffner F., Grote E.H., Risau W., Engelhardt B. // *Acta Neuropathol.* 2003. Vol. 105. P. 586–592.
27. Claudin-3 acts as a sealing component of the tight junction for ions of either charge and uncharged solutes / Milatz S., Krug S.M., Rosenthal R., Günzel D., Müller D., Schulzke J.D., Amasheh S., Fromm M. // *Biochem. Biophys. Acta: Biomembr.* 2010. Vol. 1798, N 11. P. 2048–2057.
28. Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice / Nitta T., Hara M., Gotoh S., Seo Y., Sasaki H., Hashimoto N., Furuse M., Tsukita S. // *J. Cell Biol.* 2003. Vol. 161. P. 653–660.
29. Structure and function of claudins / Krause G., Winkler L., Mueller S.L., Haseloff R.F., Piontek J., Blasig I.E. // *Biochem. Biophys. Acta.* 2008. Vol. 1778, N 3. P. 631–645.
30. *Alexandre M.D., Lu Q., Chen Y.H.* Overexpression of claudin-7 decreases the paracellular Cl conductance and increases the paracellular Na<sup>+</sup> conductance in LLC-PK1 cells // *J. Cell Sci.* 2005. Vol. 118, Pt. 12. P. 2683–2693.
31. *Hou J., Gomes A.S., Paul D.L., Goodenough D.A.* Study of claudin function by RNA interference // *J. Biol. Chem.* 2006. Vol. 281. P. 36117–36123.
32. Altered claudin expression is a feature of chronic plaque psoriasis / Watson R.E., Poddar R., Walker J.M., McGuill I., Hoare L.M., Griffiths C.E., O'Neill C.A. // *J. Pathol.* 2007. Vol. 212, N 4. P. 450–458.
33. TNF-alpha up-regulates claudin-2 expression in epithelial HT-29/B6 cells via phosphatidylinositol-3-kinase signaling / Mankertz J., Amasheh M., Krug S.M., Fromm A., Amasheh S., Hillenbrand B., Tavalali S., Fromm M., Schulzke J.D. // *Cell Tissue Res.* 2009. Vol. 336, N 1. P. 67–77.
34. Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution / Heller F., Florian P., Bojarski C., Christ M., Hillenbrand B., Mankertz J., Gitter A.H., Bürgel N., Fromm M., Zeitz M., Fuss I., Strober W., Schulzke J.D. // *Gastroenterology.* 2005. Vol. 129, N 2. P. 550–564.
35. Mechanisms of diarrhea in collagenous colitis / Bürgel N., Bojarski C., Mankertz J., Zeitz M., Fromm M., Schulzke J.D. // *Gastroenterology.* 2002. Vol. 123. P. 433–443.

Статья поступила в редакцию 15 марта 2012 г.