

Е. Л. Фальчук, А. Г. Марков

ИЗУЧЕНИЕ БАРЬЕРНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК ЭПИТЕЛИЯ ПЕЙЕРОВЫХ БЛЯШЕК КРЫСЫ

Проведено сравнительное исследование барьерных свойств фолликул-ассоциированного эпителия Пейеровых бляшек и ворсинчатого эпителия тонкой кишки крысы. Проницаемость эпителия Пейеровых бляшек, исследованная в камере Уссинга, достоверно меньше проницаемости ворсинчатого эпителия. В плотных контактах эпителия Пейеровых бляшек повышен уровень клаудинов, ограничивающих парацеллюлярный транспорт, и снижен уровень клаудинов, увеличивающих проницаемость эпителия. Предполагается, что ограничение парацеллюлярного транспорта является условием для представления патогенов через специализированные клетки эпителия Пейеровых бляшек. Библиогр. 29 назв. Ил. 4.

Ключевые слова: Пейеровы бляшки, эпителий, тонкая кишка, парацеллюлярный путь, плотные контакты, клаудины, электрофизиология, проводимость.

E. L. Falchuk, A. G. Markov

THE STUDY OF BARRIER CHARACTERISTICS OF PEYER'S PATCHES EPITHELIUM IN RATS

St. Petersburg State University, 7/9, Universitetskaya nab., St. Petersburg, 199034, Russian Federation; falchukevgeny@gmail.com, markov_51@mail.ru

The aim of the study was to investigate the barrier function of Peyer's patches epithelium, which covers the clusters of organized lymphoid tissues in the small intestinal. We used the Ussing chamber method to determine electrophysiological characteristics of epithelium and Western blot method and immunohistochemistry to investigate expression of tight junction proteins. We revealed that Peyer's patches epithelium, which is specialized in sampling and transporting of antigen structures, has lower conductance compare to adjacent intestinal villous epithelium, the main function of which is to uptake ions, water and nutrients. On molecular level Peyer's patch epithelium has lower expression of claudin-2 and claudin-7, which increases the permeability of the intercellular space, and higher expression of claudin-5 and -8, which decreases the paracellular pathway. Immunohistochemistry confirmed localization of claudins in the tight junction complex. We suggest that the restriction of paracellular transport is a prerequisite for the antigen presentation through specialized M-cells in Peyer's patches epithelium. Refs 29. Figs 4.

Keywords: Peyer's patches, epithelium, small intestinal, paracellular pathway, tight junction, claudins, electrophysiology, conductance.

Слизистая оболочка кишки представляет собой тканевой барьер, предотвращающий проникновение патогенов в организм. Основными структурами в стенке кишки, ответственными за распознавание антигенных детерминант, содержащихся в химусе (в том числе вирусов и бактерий), являются Пейеровы бляшки (ПБ) — сгруппированные лимфоидные фолликулы, покрытые специализированным фолликул-ассоциированным эпителием (ФАЭ) [1]. Захват и перенос антигенов через ФАЭ — необходимый этап для запуска иммунного ответа. Трансцеллюлярный путь распознавания и представления антигенов осуществляется через специализированные М-клетки [2]. Другим возможным путем проникновения антигенов служит парацеллюлярный транспорт [3, 4]. Осуществление парацеллюлярного

Е. Л. Фальчук (falchukevgeny@gmail.com), А. Г. Марков (markov_51@mail.ru): Санкт-Петербургский государственный университет, Российская Федерация, 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9.

транспорта обусловлено наличием в составе слизистой оболочки дендритных клеток, а также существованием плотных контактов между соседними энтероцитами [5]. Отростки дендритных клеток проникают по межклеточному пространству между эпителиоцитами и захватывают бактерии непосредственно из просвета кишки [6].

Плотные контакты представляют собой межклеточные комплексы, расположенные в апикальной области плазматических мембран соседних эпителиоцитов и формирующие селективный парацеллюлярный барьер для ионов и макромолекул. Плотные контакты состоят из различных трансмембранных белков, которые объединены в две группы: семейство белков MARVEL, включающее в себя окклюдин, трицеллюлин и marvelD3, и семейство белка клаудина, насчитывающее 27 членов [7]. Часть белков семейства клаудина, такие как клаудин-1, -3, обеспечивают повышение барьерных свойств эпителия [8, 9]. Другие, например, клаудин-2 и -7, образуют поры для ионов, воды и макромолекул [10, 11].

В настоящее время установлено, что барьерные свойства эпителия различных сегментов кишки коррелируют с молекулярным составом клаудинов в плотных контактах [12]. Данные относительно барьерных свойств ФАЭ, а также наличия клаудинов в плотных контактах эпителия Пейеровых бляшек остаются весьма немногочисленными. На сегментах тонкой кишки кролика установлено, что для Пейеровых бляшек характерно более высокое значение трансэпителиального сопротивления по сравнению с ворсинчатым эпителием кишки [13]. Остается неясным, является ли данный феномен характерным признаком Пейеровых бляшек кишки кролика или данная закономерность существует и у других видов животных? Также немногочисленны сведения о клаудинах в ФАЭ Пейеровых бляшек. С помощью иммуногистохимии было показано наличие клаудина-1, -2, -3 и -4 в ФАЭ Пейеровых бляшек тонкой кишки мыши [14, 15]. Сравнительный анализ уровня клаудинов в ФАЭ Пейеровых бляшек и в ворсинчатом эпителии не проводился. Цель данной работы — сопоставление барьерных свойств эпителия, а также уровня клаудинов в Пейеровых бляшках и ворсинчатом эпителии тощей кишки крысы.

Материал и методика

Эксперименты проводили на самцах линии Вистар (180–250 г; $n = 28$). Животные содержались на стандартном рационе вивария, со свободным доступом к пище и воде. После анестезии проводили эвтаназию путем церебральной дислокации.

У животных иссекали тонкую кишку, промывали оксигенированным раствором Кребса—Рингера, разрезали по линии брыжейки и вырезали Пейеровы бляшки из двенадцатиперстной, тощей и подвздошной кишки. Для проведения сравнительного анализа с тканью ворсинчатого эпителия из сегмента тощей кишки вырезали участки без Пейеровых бляшек (контрольная ткань). Отделения мышечно-го и подслизистого слоев не производилось. После процесса препаровки каждую ткань помещали в отдельную камеру Уссинга.

Изучение электрофизиологических характеристик. Каждая установка включает в себя несколько элементов: камеру для ткани, стеклянный резервуар, электроды, предусилитель EVC3 и многоканальный автоматический фиксатор тока и напряжения EVC-4000 (World Precision Instruments, США). Камера для ткани пред-

ставляет собой полый цилиндр из двух половин, между которыми вертикально монтируется препарат для исследования, создавая таким образом два отдельных компартмента: «серозный» и «мукозный». Площадь изучаемой ткани соответствует диаметру отверстия камер и равняется $0,13 \text{ см}^2$. Каждая половина сообщается с отдельным стеклянным резервуаром, в котором циркулирует 5 мл раствора Кребса—Рингера: 119мМ NaCl, 5мМ KCl, 1,2мМ $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 25мМ NaHCO_3 , 0,4мМ $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1,6мМ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,2мМ CaCl_2 (Sigma Aldrich, Германия). Раствор, омывающий серозную сторону ткани, дополнительно содержит 10мМ D-глюкозы в качестве источника энергии. Для сохранения осмотического давления раствор, омывающий «мукозную» сторону, содержит 10мМ маннита. Стеклянный резервуар имеет водяную рубашку для контроля температуры омывающего раствора (37°C) и порт для аэрации карбогеном (95% O_2 и 5% CO_2). Для изучения электрофизиологических характеристик используются четыре хлорсеребряных электрода (World Precision Instruments, США): два для регистрации разности потенциалов и фиксации напряжения и два для регистрации и фиксации тока.

Регистрация тока «короткого замыкания» происходила в условиях фиксации напряжения на 0 мВ. Для изучения проводимости регистрировали изменение напряжения в ответ на ток величиной 10 мкА. Проводимость является величиной обратной сопротивлению ($R = U/I$) и, исходя из закона Ома, рассчитывается по формуле $G = I/U$. Полученное значение корректировали относительно площади исследуемой ткани ($\text{мСи}/\text{см}^2$).

После экспериментов в камере Уссинга образцы ткани Пейеровых бляшек и ворсинчатого эпителия были зафиксированы с помощью криофиксации (-80°C) для проведения Вестерн-блота и в 4%-ном формалине (120 мин, 22°C) для проведения иммуногистохимии.

Вестерн-блот. Для идентификации белков плотных контактов в ткани был использован метод Вестерн-блот [16]. Образцы ткани гомогенизировали в лизирующем буфере с добавлением ингибиторов протеаз (Complete, Roche, Германия). Фракция мембранных белков была получена с помощью последовательного центрифугирования при 200g (5 мин, 4°C) и 43000g (30 мин, 4°C). Полученные пробы инкубировались в термостате (30 мин, 37°C) с добавлением Pierce Protein Assay Kit (Thermo Scientific, США). Концентрация белка в пробе определялась с использованием спектрофотометра Tecan Spectra (Tecan, Швейцария) при длине волны 562 нм. На следующем этапе белки разделялись по молекулярной массе с помощью электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) с содержанием SDS 12,5% (100 В, 90 мин, 22°C). Далее белки переносились с ПААГ на гидрофобные мембраны при 100 В (60 мин, 22°C). Для иммунодетекции их последовательно инкубировали в блокирующем растворе (TBS, 5%-ное сухое молоко) (120 мин, 22°C) (Sigma Aldrich, Германия); в растворе первичных антител к клаудину-2, -5, -7 и -8 (Invitrogen, США) (60 мин, 22°C); в растворе вторичных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена (1:2000) (Invitrogen, США) (60 мин, 22°C). Визуализация белков осуществлялась после инкубации мембран в растворе Lumi-LightPLUS (Roche Diagnostics, Германия) (5 мин, 22°C) на анализаторе изображений LAS-1000 (Fujifilm, Япония). Обработка изображений выполнялась с помощью программного обеспечения AIDA Raytest 2.5 (Straubenhardt, Германия).

Полученные результаты представлены в виде условных единиц. Содержание каждого отдельного белка в ткани ворсинчатого эпителия принималось за 100%, и относительно них высчитывались значения для Пейеровых бляшек.

Иммуногистохимическое окрашивание. Процедуры заливки ткани в парафиновые блоки, получения срезов и окраски выполнялись согласно описанной ранее методике [17]. Парафиновые срезы фиксировали на предметных стеклах и после депарафинизации инкубировали в блокирующем растворе (PBS, 5% козья сыворотка, 1% БСА) (Sigma Aldrich, Германия) (60 мин, 22 °С). Детекция белков на срезах производилась с помощью первичных мышинных антител к окклюдину и первичных кроличьих антител к клаудину-2, -5, -7 и -8 (Invitrogen, США) (60 мин, 37 °С). После промывки стекол блокирующим раствором для визуализации белков использовались вторичные козьи антимышинные антитела Alexa Fluor 594 и вторичные козьи антикроличьи антитела Alexa Fluor 488 (Invitrogen, США) (45 мин, 37 °С). Перед нанесением покровных стекол срезы инкубировали с красителем DAPI для последующей визуализации клеточных ядер (5 мин, 22 °С). Анализ полученных изображений производился с помощью лазерного сканирующего микроскопа LSM 510 META (Zeiss, Германия) и программного обеспечения LSM Image Browser (Zeiss, Германия). Для метки окклюдина на полученных препаратах характерно зеленое свечение, для белков семейства клаудина — красное. В случае колокализации окклюдина и клаудина регистрировалось желто-оранжевое свечение.

Статистическая обработка результатов. Полученные результаты обрабатывали с помощью программы прикладного статистического анализа IBM SPSS Statistics 21 с использованием статистического критерия Вилкоксона и *t*-критерия Стьюдента. Уровень значимости $p < 0,05$ принимался как статистически значимый.

Результаты

Сравнение электрофизиологических характеристик Пейеровых бляшек из разных сегментов тонкой кишки. Во всех экспериментах мукозная сторона стенки кишки, содержащая Пейеровы бляшки, была заряжена отрицательно по отношению к серозной стороне кишки (рис. 1, а). Максимальное значение трансэпителиальной разности потенциалов было зарегистрировано в Пейеровых бляшках двенадцатиперстной кишки — $1,7 \pm 0,2$ мВ ($n = 5$). В Пейеровых бляшках тощей и подвздошной кишки эта величина составляла соответственно $1,5 \pm 0,1$ и $1,0 \pm 0,1$ мВ ($n = 5$). Достоверных отличий между этими величинами обнаружено не было ($p \geq 0,05$; Т-критерий Вилкоксона).

Величина тока «короткого замыкания» также достоверно не отличалась в исследованных образцах ткани (рис. 1, б), значения составили для Пейеровых бляшек в двенадцатиперстной кишке — $13 \pm 1,6$ мкА/см², в тощей кишке — $9 \pm 1,1$ мкА/см² и в подвздошной — $9 \pm 0,9$ мкА/см².

Максимальное значение проводимости было зарегистрировано в Пейеровых бляшках подвздошной кишки — $11 \pm 1,1$ мСи/см², что, однако, достоверно не отличалось от проводимости Пейеровых бляшек двенадцатиперстной и тощей кишки ($10 \pm 1,4$ и $9 \pm 0,4$ мСи/см² соответственно) (рис. 1, в).

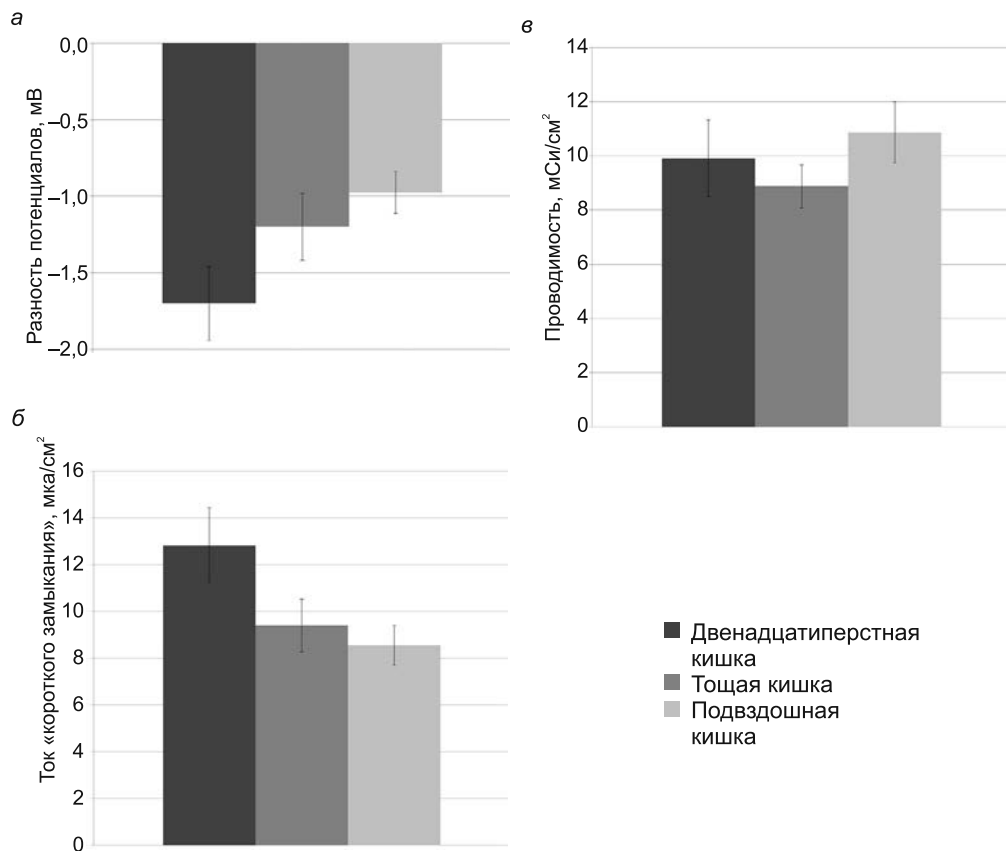


Рис. 1. Электрофизиологические характеристики Пейеровых бляшек из разных сегментов тонкой кишки крысы:

а — трансэпителиальная разность потенциалов; б — ток «короткого замыкания»; в — проводимость. То же для рис. 2.

Эти электрофизиологические параметры оставались постоянными для Пейеровых бляшек всех сегментов кишки в течение 30-минутной регистрации.

Таким образом, не было обнаружено статистически достоверных отличий в электрофизиологических характеристиках Пейеровых бляшек из разных участков тонкой кишки крысы.

Сравнение электрофизиологических характеристик ткани Пейеровых бляшек и ворсинчатого эпителия тощей кишки. В результате проведенных экспериментов (ворсинчатый эпителий $n = 23$, Пейеровы бляшки $n = 18$) показано, что трансэпителиальная разность потенциалов ворсинчатого эпителия не отличается достоверно от Пейеровых бляшек ($1,6 \pm 0,1$ мВ и $1,5 \pm 0,1$ мВ соответственно; $p \geq 0,05$, t -тест Стьюдента) (рис. 2, а). При этом во всех экспериментах мукозная сторона ворсинчатого эпителия ткани также была заряжена отрицательно по сравнению с серозной стороной.

Регистрация тока «короткого замыкания» показала, что значение в ворсинчатом эпителии составляет $25 \pm 1,7$ мкА/см² и статистически достоверно отличается от такового в Пейеровых бляшках — $13 \pm 1,1$ мкА/см² ($p < 0,001$) (рис. 2, б).

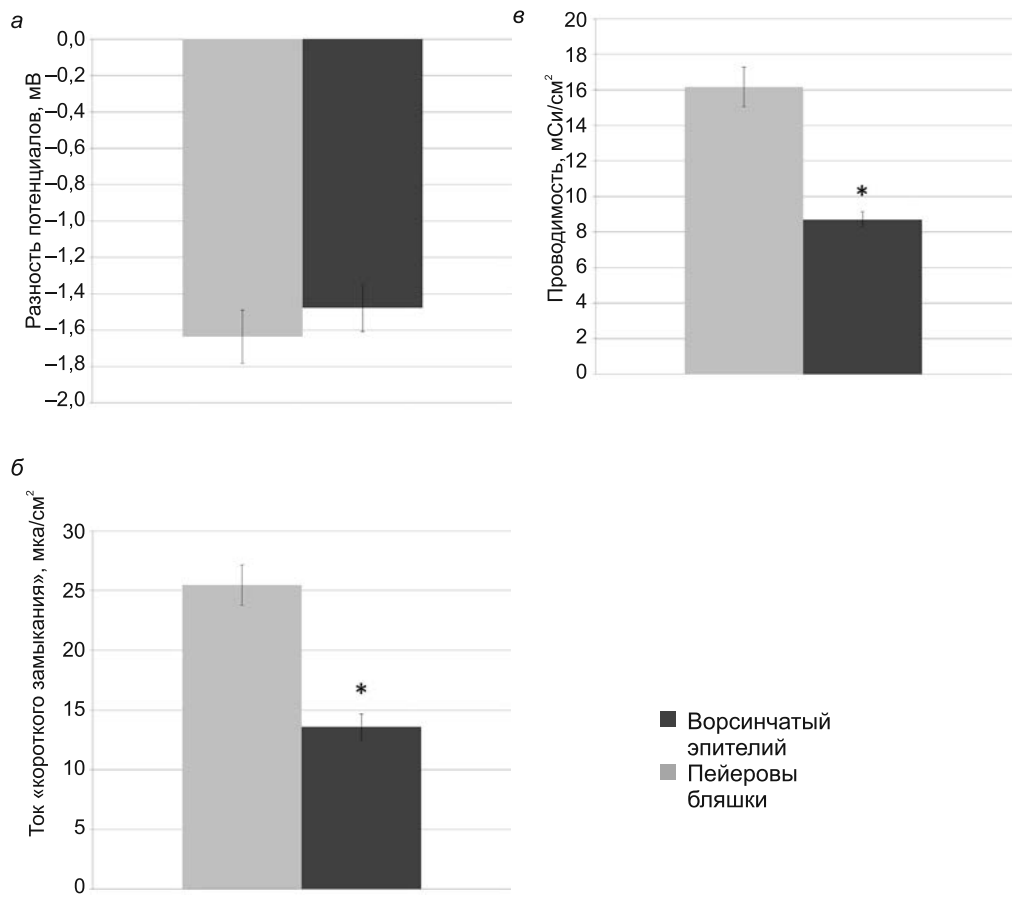


Рис. 2. Электрофизиологические характеристики Пейеровых бляшек и ворсинчатого эпителия тощей кишки крысы:

а — трансэпителиальная разность потенциалов; б — ток «короткого замыкания»; в — проводимость. * — $p < 0,001$.

Величина проводимости двух образцов ткани тощей кишки также отличается: в ворсинчатом эпителии проводимость равняется $16 \pm 1,1$ мСи/см², то время как проводимость Пейеровых бляшек достоверно меньше — $9 \pm 0,4$ мСи/см² ($p < 0,001$) (рис. 2, в).

Сравнительный анализ уровня белков плотных контактов в эпителии Пейеровых бляшек и ворсинчатом эпителии тощей кишки. В ФАЭ Пейеровых бляшек и в ворсинчатом эпителии были обнаружены клаудин-2, -5, -7 и -8 (рис. 3, а). Клаудины идентифицировались как белки молекулярной массой 18–24 кДа.

При анализе результатов Вестерн-блот для отдельных клаудинов была выявлена разница в интенсивности сигналов в исследованных образцах. С помощью метода денситометрии было установлено, что уровень белков клаудина-5 ($n = 5$) и клаудина-8 ($n = 4$) был достоверно выше в ткани Пейеровых бляшек по сравнению с ворсинчатым эпителием ($p < 0,05$, T-критерий Вилкоксона) (рис. 3, б). Одновременно уровень экспрессии клаудина-2 ($n = 5$) и клаудина-7 ($n = 4$) был достоверно

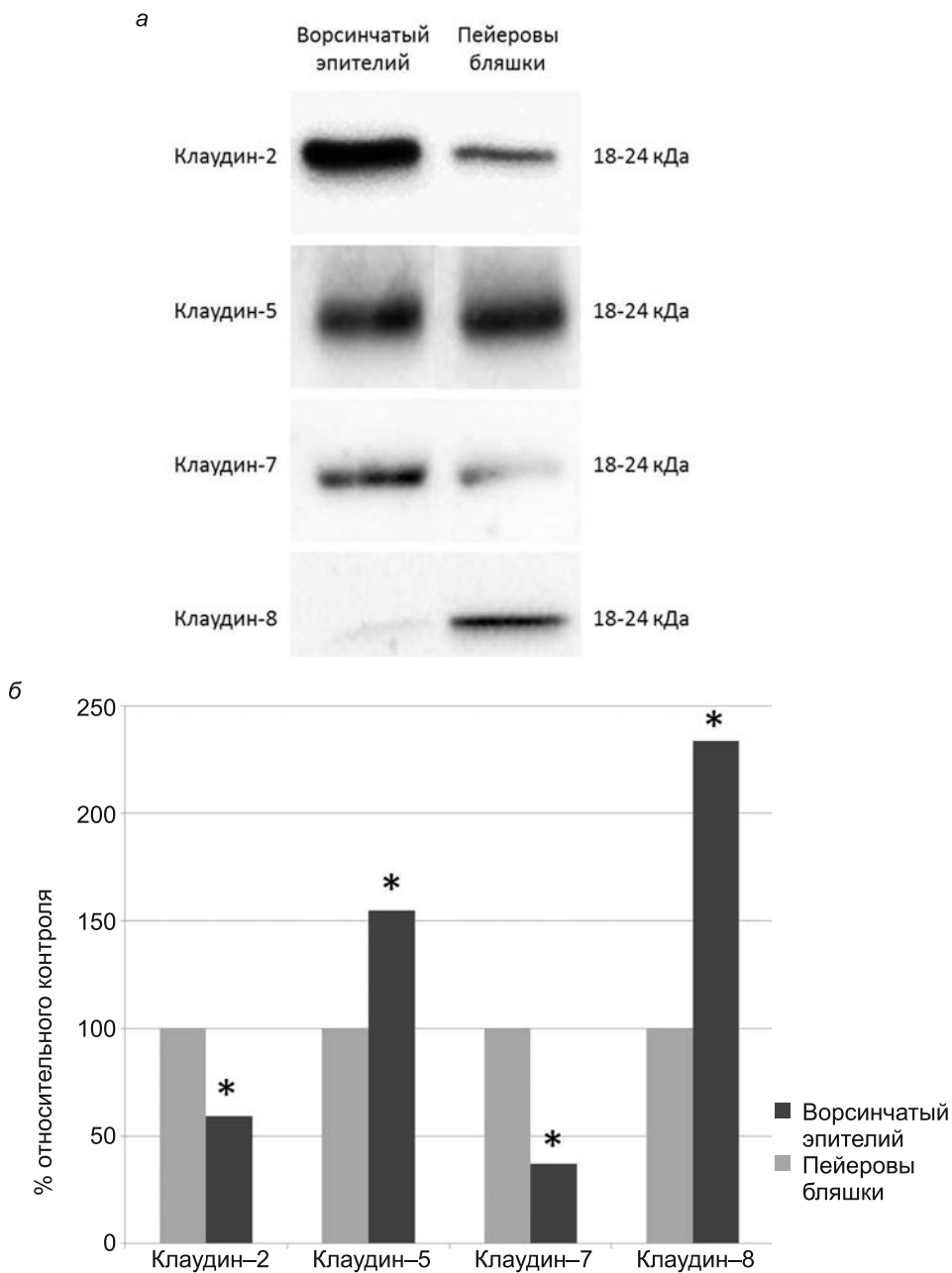


Рис. 3. Экспрессия белков плотных контактов клаудина-2, -5, -7 и -8 в Пейеровых бляшках и ворсинчатом эпителии тощей кишки крысы:

а — оригинальные изображения Вестерн-блот; *б* — сравнение интенсивности сигнала белков плотных контактов в Пейеровых бляшках и ворсинчатом эпителии с помощью метода денситометрии. * — $p < 0,05$.

снижен в эпителии Пейеровых бляшек по сравнению с ворсинчатым эпителием тощей кишки ($p < 0,05$).

Локализация белков плотных контактов в ткани Пейеровых бляшек тощей кишки. Иммуногистохимическое исследование показало, что белок окклюдин, который используется как маркер плотных контактов, располагается в апико-латеральной части клеток эпителия Пейеровых бляшек и ворсинчатого эпителия тощей кишки (рис. 4, а, зеленое свечение). Иммунодетекция клаудина-2 показала, что данный белок располагается в области плотных контактов клеток в обеих тканях (рис. 4, а, б), а также в базолатеральной мембране клеток ФАЭ Пейеровых бляшек. Изучение локализации клаудина-5 (красный сигнал) по-

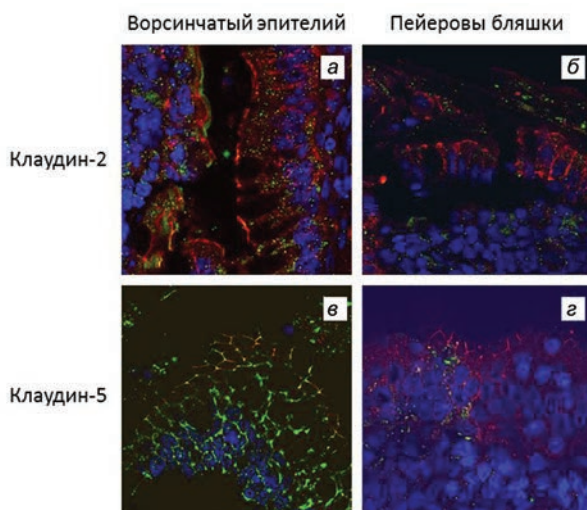


Рис. 4. Иммуногистохимическое окрашивание белков плотных контактов в ФАЭ Пейеровых бляшек и ворсинчатом эпителии тощей кишки крысы

а, б — клаудин-2; в, г — клаудин-5. Зеленое свечение указывает на локализацию белка окклюдина, красное — белка клаудина. Синее свечение — окраска ядер флуоресцентным красителем DAPI.

зволило выявить, что данный белок располагается в области плотных контактов в клетках эпителия Пейеровых бляшек и ворсинчатого эпителия. Клаудин-7 также был обнаружен в области плотных контактов в клетках обоих эпителиев, при этом подобно клаудину-2 клаудин-7 распределен в базолатеральной мембране клеток ФАЭ Пейеровых бляшек.

Обсуждение

Полученные данные свидетельствуют о том, что барьерные свойства ФАЭ Пейеровых бляшек и расположенного рядом ворсинчатого эпителия различаются. Анализируя результаты исследования, стоит принимать во внимание то, что параметр проницаемости эпителиальной ткани является интегральным и включает в себя проницаемость апикальной и базолатеральной мембран клетки, а также проницаемость межклеточного пространства. Таким образом, пониженная прони-

цаемость ФАЭ Пейеровых бляшек по сравнению с проницаемостью ворсинчатого эпителия может быть обусловлена снижением транспорта электролитов через ФАЭ и/или снижением проницаемости парацеллюлярного пути.

Величина тока «короткого замыкания», которая является отражением процессов первично- и вторично-активного транспорта ионов и веществ, достоверно ниже в ФАЭ Пейеровых бляшек. Важно отметить подтверждение на функциональном уровне проведенного ранее анализа транспортеров и переносчиков в ткани: в эпителии Пейеровых бляшек снижена экспрессия Na^+/K^+ АТФ-азы [18], которая является ведущим звеном в обеспечении векторного транспорта через эпителий. Кроме этого, в ФАЭ Пейеровых бляшек мыши в отличие от ФАЭ ворсинчатого эпителия кишки не экспрессируется белок-переносчик SGLT1 [19], обеспечивающий котранспорт ионов натрия и глюкозы. Отмечают также отсутствие транспортера глюкозы GLUT2 [19, 20] и низкий уровень экспрессии пептидного транспортера Pept1 [21].

Однако на основании полученных данных об уровне клаудинов можно утверждать, что отличие барьерных свойств в ФАЭ происходит также в результате снижения проницаемости парацеллюлярного пути. Известно, что трансфекция клеток генами клаудина-2 в клеточных линиях ведет к увеличению проводимости эпителиального слоя [10]. Наоборот, в аналогичных исследованиях для клаудина-5 отмечено снижение проницаемости эпителия [22]. В настоящее время оба этих белка определены как «пороформирующий» клаудин-2 и «уплотняющий» белок клаудин-5. Обсуждение точной роли клаудина-7 и клаудина-8 продолжается, однако показано, что снижение количества белка клаудина-7 в ткани может приводить к снижению проницаемости [23], а увеличение экспрессии гена клаудина-8 к увеличению трансэпителиального сопротивления [24, 25]. В данных исследованиях важен тот факт, что изменение проницаемости происходит не только для ионов, но и для макромолекул [10, 22, 24].

Полученные данные о снижении уровня клаудина-2 и -7 при одновременном повышении уровня клаудина-5 и -8 служат подтверждением того, что парацеллюлярная проницаемость ФАЭ Пейеровых бляшек ниже, чем в ворсинчатом эпителии. Таким образом, ФАЭ Пейеровых бляшек характеризуется увеличением барьерных свойств по сравнению с аналогичными свойствами ворсинчатого эпителия.

Как отмечалось ранее, на примере тонкой кишки кролика показано, что ворсинчатый эпителий обладает более низким значением трансэпителиального сопротивления по сравнению с эпителием Пейеровых бляшек [13]. Совпадение результатов, полученных на кишке крысы и кролика позволяет полагать, что данная закономерность отражает важное различие в функциях ФАЭ и ворсинчатого эпителия. В то время как основная задача ворсинчатого эпителия — всасывание ионов, воды и макромолекул, главная функция ФАЭ Пейеровых бляшек состоит в захвате и транспорте патогенных структур из просвета кишки [1]. Следует обратить внимание на следующий интересный факт. При изучении проникновения отростков дендритных клеток между эпителиоцитами для захвата *S. typhimurium* из просвета кишки было обнаружено, что этот процесс сопровождается формированием структуры плотных контактов между дендритами и эпителиальными клетками, главным образом благодаря экспрессии клаудина-1, который ограничивает межклеточную проницаемость [6]. Таким образом, обеспечивается поддержание непроницаемости межклеточного пути в частности и сохранение целостности эпителиального барьера в целом.

В связи с этим возникает вопрос: является ли такое ограничение парацеллюлярного транспорта в ФАЭ Пейеровых бляшек одним из необходимых условий представления антигенных структур иммунокомпетентным клеткам. Если данное предположение подтвердится, то необходимо признать, что формирование и сохранение непроницаемости эпителиального слоя является существенным фактором для развития нормального иммунного ответа.

В настоящее время имеются данные, что различные компоненты химуса способны оказывать влияние на структуру плотных контактов и уровень синтеза белков плотных контактов в ворсинчатом эпителии [26]. К таким веществам можно отнести элементы пищи [27], жёлчные кислоты [28], цитокины [29] или токсины, в том числе холерный токсин [17]. При этом эффект широкого спектра эндогенных и экзогенных агентов, присутствующих в просвете кишки, на барьерные характеристики эпителия Пейеровых бляшек остается неизученным. Вероятно, что действие различных гормональных, нервных или локальных веществ на структуру плотных контактов может приводить к нарушению целостности эпителиального барьера и, как следствие, нарушению работы лимфоидной системы, ассоциированной со слизистой кишки, дисфункции пищеварительной системы и развитию воспалительных процессов.

Литература

1. Jung C., Hugot J. P., Barreau F. Peyer's Patches: The Immune Sensors of the Intestine // *Int. J. Inflamm.* 2010. doi: 10.4061/2010/823710.
2. Owen R. L., Jones A. L. Epithelial cell specialization within human Peyer's patches: an ultrastructural study of intestinal lymphoid follicles // *Gastroenterology*. 1974. Vol. 66, N 2. P. 189–203.
3. Boehm M., Hoy B., Rohde M. et al. Rapid paracellular transmigration of *Campylobacter jejuni* across polarized epithelial cells without affecting TER: role of proteolytic-active HtrA cleaving E-cadherin but not fibronectin // *Gut Pathog.* 2012. Vol. 4. doi: 10.1186/1757-4749-4-3.
4. Kops S. K., Lowe D. K., Bement W. M. et al. Migration of *Salmonella typhi* through intestinal epithelial monolayers: an *in vitro* study // *Microbiol. Immunol.* 1996. Vol. 40, N 11. P. 799–811.
5. Hopkins S. A., Niedergang F., Corthesy-Theulaz I. E. et al. A recombinant *Salmonella typhimurium* vaccine strain is taken up and survives within murine Peyer's patch dendritic cells // *Cell Microbiol.* 2000. Vol. 2, N 1. P. 59–68.
6. Rescigno M., Urbano M., Valzasina B. et al. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria // *Nat. Immunol.* 2001. Vol. 2, N 4. P. 361–367.
7. Günzel D., Fromm M. Claudins and other tight junction proteins // *Compr. Physiol.* 2012. Vol. 2, N 3. P. 1819–1852.
8. Furuse M., Hata M., Furuse K. et al. Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice // *J. Cell Biol.* 2002. Vol. 156. P. 1099–1111.
9. Milatz S., Krug S. M., Rosenthal R. et al. Claudin-3 acts as a sealing component of the tight junction for ions of either charged and uncharged solutes // *Biochim. Biophys. Acta.* 2010. Vol. 1798, N 11. P. 2048–2057.
10. Amasheh S., Meiri N., Gitter A. H. et al. Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells // *J. Cell Sci.* 2002. Vol. 15, N 115. P. 4969–4976.
11. Krug S. M., Günzel D., Conrad M. P. et al. Charge-selective claudin channels // *Ann. NY Acad. Sci.* 2012. Vol. 1257. P. 20–28.
12. Markov A. G., Veshnyakova A., Fromm M. et al. Segmental expression of claudin proteins correlates with tight junction barrier properties in rat intestine // *J. Comp. Physiol. B.* 2010. Vol. 180, N 4. P. 591–598.
13. Brayden D. J., Baird A. W. A distinctive electrophysiological signature from the Peyer's patches of rabbit intestine // *Br. J. Pharmacol.* 1994. Vol. 113, N 2. P. 593–599.
14. Clark M. A., Hirst B. H. Expression of junction-associated proteins differentiates mouse intestinal M cells from enterocytes // *Histochem. Cell Biol.* 2002. Vol. 118. P. 137–147.
15. Tamagawa H., Takahashi I., Furuse M. et al. Characteristics of claudin expression in follicle-associated

epithelium of Peyer's patches: preferential localization of claudin-4 at the apex of the dome region // *Lab. Invest.* 2003. Vol. 83, N 7. P. 1045–1053.

16. Florian P., Amasheh S., Lessidrensky M. et al. Claudins in the tight junctions of stria vascularis marginal cells // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003. Vol. 304, N 1. P. 5–10.

17. Markov A. G., Falchuk E. L., Kruglova N. M. et al. Comparative analysis of theophylline and cholera toxin in rat colon reveals an induction of sealing tight junction proteins // *Pflugers Arch.* 2014. Vol. 466, N 11. P. 2059–2065.

18. Mason C. M., Jepson M. A., Simmons N. L. et al. Heterogenous Na⁺, K⁽⁺⁾-ATPase expression in the epithelia of rabbit gut-associated lymphoid tissues // *Pflugers Arch.* 1994. Vol. 427, N 3–4. P. 343–347.

19. Yoshikawa T., Inoue R., Matsumoto M. et al. Comparative expression of hexose transporters (SGLT1, GLUT1, GLUT2 and GLUT5) throughout the mouse gastrointestinal tract // *Histochem. Cell Biol.* 2011. Vol. 135, N 2. P. 183–194.

20. Renes I. B., Verburg M., Bulsing N. P. et al. Protection of the Peyer's patch-associated crypt and villus epithelium against methotrexate-induced damage is based on its distinct regulation of proliferation // *J. Pathol.* 2002. Vol. 198, N 1. P. 60–68.

21. Freeman T. C., Bentsen B. S., Thwaites D. T. et al. H⁺/di-tripeptide transporter (PepT1) expression in the rabbit intestine // *Pflugers Arch.* 1995. Vol. 430, N 3. P. 394–400.

22. Amasheh S., Schmidt T., Mahn M. et al. Contribution of claudin-5 to barrier properties in tight junctions of epithelial cells // *Cell Tissue Res.* 2005. Vol. 321, N 1. P. 89–96.

23. Hou J., Gomes A. S., Paul D. L. et al. Study of claudin function by RNA interference // *J. Biol. Chem.* 2006. Vol. 281, N 47. P. 36117–36123.

24. Yu A. S., Enck A. H., Lencer W. I. et al. Claudin-8 expression in Madin—Darby canine kidney cells augments the paracellular barrier to cation permeability // *J. Biol. Chem.* 2003. Vol. 278, N 19. P. 17350–17359.

25. Angelow S., Kim K. J., Yu A. S. Claudin-8 modulates paracellular permeability to acidic and basic ions in MDCK II cells // *J. Physiol.* 2006. Vol. 571. P. 15–26.

26. Ulluwishewa D., Anderson R. C., McNabb W. C. et al. Regulation of tight junction permeability by intestinal bacteria and dietary components // *J. Nutr.* 2011. Vol. 141, N 5. P. 769–776.

27. Hering N. A., Andres S., Fromm A. et al. Transforming growth factor- β , a whey protein component, strengthens the intestinal barrier by upregulating claudin-4 in HT-29/B6 cells // *J. Nutr.* 2011. Vol. 141, N 5. P. 783–789.

28. Raimondi F., Santoro P., Barone M. V. et al. Bile acids modulate tight junction structure and barrier function of Caco-2 monolayers via EGFR activation // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2008. Vol. 294, N 4. P. 906–913.

29. McKay D. M., Baird A. W. Cytokine regulation of epithelial permeability and ion transport // *Gut.* 1999. Vol. 44, N 2. P. 283–289.

References

1. Jung C., Hugot J. P., Barreau F. Peyer's Patches: The Immune Sensors of the Intestine. *Int. J. Inflamm.* 2010, doi: 10.4061/2010/823710.

2. Owen R. L., Jones A. L. Epithelial cell specialization within human Peyer's patches: an ultrastructural study of intestinal lymphoid follicles. *Gastroenterology*, 1974, vol. 66, no. 2, pp. 189–203.

3. Boehm M., Hoy B., Rohde M. et al. Rapid paracellular transmigration of *Campylobacter jejuni* across polarized epithelial cells without affecting TER: role of proteolytic-active HtrA cleaving E-cadherin but not fibronectin. *Gut Pathog.* 2012, vol. 4, doi: 10.1186/1757-4749-4-3.

4. Kops S. K., Lowe D. K., Bement W. M. et al. Migration of *Salmonella typhi* through intestinal epithelial monolayers: an in vitro study. *Microbiol. Immunol.* 1996, vol. 40, no. 11, pp. 799–811.

5. Hopkins S. A., Niedergang F., Corthesy-Theulaz I. E. et al. A recombinant *Salmonella typhimurium* vaccine strain is taken up and survives within murine Peyer's patch dendritic cells. *Cell Microbiol.* 2000, vol. 2, no. 1, pp. 59–68.

6. Rescigno M., Urbano M., Valzasina B. et al. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat. Immunol.* 2001, vol. 2, no. 4, pp. 361–367.

7. Günzel D., Fromm M. Claudins and other tight junction proteins. *Compr. Physiol.* 2012, vol. 2, no. 3, pp. 1819–1852.

8. Furuse M., Hata M., Furuse K. et al. Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J. Cell Biol.* 2002, vol. 156, pp. 1099–1111.

9. Milatz S., Krug S. M., Rosenthal R. et al. Claudin-3 acts as a sealing component of the tight junction for ions of either charge and uncharged solutes. *Biochim. Biophys. Acta*, 2010, vol. 1798, no. 11, pp. 2048–2057.

10. Amasheh S., Meiri N., Gitter A. H. et al. Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells. *J. Cell Sci.*, 2002, vol. 15, no. 115, pp. 4969–4976.
11. Krug S. M., Günzel D., Conrad M. P. et al. Charge-selective claudin channels. *Ann. NY Acad. Sci.*, 2012, vol. 1257, pp. 20–28.
12. Markov A. G., Veshnyakova A., Fromm M. et al. Segmental expression of claudin proteins correlates with tight junction barrier properties in rat intestine. *J. Comp. Physiol.*, B. 2010, vol. 180, no. 4, pp. 591–598.
13. Brayden D. J., Baird A. W. A distinctive electrophysiological signature from the Peyer's patches of rabbit intestine. *Br. J. Pharmacol.*, 1994, vol. 113, no. 2, pp. 593–599.
14. Clark M. A., Hirst B. H. Expression of junction-associated proteins differentiates mouse intestinal M cells from enterocytes. *Histochem. Cell Biol.*, 2002, vol. 118, pp. 137–147.
15. Tamagawa H., Takahashi I., Furuse M. et al. Characteristics of claudin expression in follicle-associated epithelium of Peyer's patches: preferential localization of claudin-4 at the apex of the dome region. *Lab. Invest.*, 2003, vol. 83, no. 7, pp. 1045–1053.
16. FloriaN P., Amasheh S., Lessidrensky M. et al. Claudins in the tight junctions of stria vascularis marginal cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2003, vol. 304, no. 1, pp. 5–10.
17. Markov A. G., Falchuk E. L., Kruglova N. M. et al. Comparative analysis of theophylline and cholera toxin in rat colon reveals an induction of sealing tight junction proteins. *Pflugers Arch.*, 2014, vol. 466, no. 11, pp. 2059–2065.
18. MasoN C. M., JepsoN M. A., Simmons N. L. et al. Heterogenous Na⁺, K⁽⁺⁾-ATPase expression in the epithelia of rabbit gut-associated lymphoid tissues. *Pflugers Arch.*, 1994, vol. 427, no. 3–4, pp. 343–347.
19. Yoshikawa T., Inoue R., Matsumoto M. et al. Comparative expression of hexose transporters, N SGLT1, GLUT1, GLUT2 and GLUT5) throughout the mouse gastrointestinal tract. *Histochem. Cell Biol.*, 2011, vol. 135, no. 2, pp. 183–194.
20. Renes I. B., Verburg M., Bulsing N. P. et al. Protection of the Peyer's patch-associated crypt and villus epithelium against methotrexate-induced damage is based on its distinct regulation of proliferation. *J. Pathol.*, 2002, vol. 198, no. 1, pp. 60–68.
21. FreemaN T. C., BenteN B. S., Thwaites D. T. et al. H⁺/di-tripeptide transporter (PepT1) expression in the rabbit intestine. *Pflugers Arch.*, 1995, vol. 430, no. 3, pp. 394–400.
22. Amasheh S., Schmidt T., MahN M. et al. Contribution of claudin-5 to barrier properties in tight junctions of epithelial cells. *Cell Tissue Res.*, 2005, vol. 321, no. 1, pp. 89–96.
23. Hou J., Gomes A. S., Paul D. L. et al. Study of claudin function by RNA interference. *J. Biol. Chem.*, 2006, vol. 281, no 47, pp. 36117–36123.
24. Yu A. S., Enck A. H., Lencer W. I. et al. Claudin-8 expression in Madin—Darby canine kidney cells augments the paracellular barrier to cation permeatio. *J. Biol. Chem.*, 2003, vol. 278, no 19, pp. 17350–17359.
25. Angelow S., Kim K. J., Yu A. S. Claudin-8 modulates paracellular permeability to acidic and basic ions in MDCK II cells. *J. Physiol.*, 2006, vol. 571, pp. 15–26.
26. Ulluwishewa D., Anderson R. C., McNabb W. C. et al. Regulation of tight junction permeability by intestinal bacteria and dietary components. *J. Nutr.*, 2011, vol. 141, no. 5, pp. 769–776.
27. Hering N. A., Andres S., Fromm A. et al. Transforming growth factor- β , a whey protein component, strengthens the intestinal barrier by upregulating claudin-4 in HT-29/B6 cells. *J. Nutr.*, 2011, vol. 141, no. 5, pp. 783–789.
28. Raimondi F., Santoro P., Barone M. V. et al. Bile acids modulate tight junction structure and barrier function of Caco-2 monolayers via EGFR activation. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 2008, vol. 294, no. 4, pp. 906–913.
29. McKay D. M., Baird A. W. Cytokine regulation of epithelial permeability and ion transport. *Gut.*, 1999, vol. 44, no. 2, pp. 283–289.

Статья поступила в редакцию 10 апреля, принята в печать 5 июня 2015 г.

Сведения об авторах:

Фальчук Евгений Леонидович — аспирант

Марков Александр Георгиевич — доктор биологический наук, профессор

Falchuk Evgeny L. — post-graduate student

Markov Alexander G. — Doctor of Biology, Professor