
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**ИЗМЕНЕНИЕ БАРЬЕРНЫХ СВОЙСТВ ТОЩЕЙ И ТОЛСТОЙ КИШКИ
КРЫСЫ ПОСЛЕ ГИПОБАРИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ**

© 2025 г. А. А. Федорова¹, Д. Д. Ганке^{1,2}, А. Е. Бикмурзина¹, В. В. Кравцова¹,
И. И. Кривой¹, А. Г. Марков^{1,2}

¹Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

²Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: a.markov@spbu.ru

Поступила в редакцию 18.06.2025 г.

После доработки 13.08.2025 г.

Принята к публикации 13.08.2025 г.

Барьерные свойства кишечного эпителия играют важную роль в поддержании гомеостаза, однако становятся уязвимыми при кислородной недостаточности. В данной работе исследовано влияние гипобарической гипоксии (соответствующей подъему на высоты 3000 и 6000 м) на морфологические параметры и барьерную функцию тощей и толстой кишки крыс. Эксперименты проводились с использованием барокамеры и включали в себя гистологический анализ, электрофизиологические измерения в камере Уссинга, оценку уровня белков плотных контактов (клаудинов-1 и -2) методом вестерн-блоттинга и их локализацию методом иммуногистохимии. Установлено, что гипобарическая гипоксия вызывает время- и сегмент-специфические изменения морфометрических параметров, барьерных характеристик и уровня клаудинов. В тощей кишке через 3 ч нарушалась структура ворсинок и снижался уровень клаудина-2, в толстой – изменялась глубина крипт, снижался уровень клаудина-1 и трансэпителиальное сопротивление. Через 24 ч после воздействия гипоксии (3000 м) наблюдалось частичное восстановление функций тощей кишки, тогда как после воздействия более выраженной гипоксии (6000 м) адаптация в толстой кишке не наступала. Полученные данные подчеркивают высокую чувствительность кишечного барьера к гипоксическому стрессу и его различную реакцию в зависимости от анатомического сегмента. Результаты могут быть полезны при разработке превентивных стратегий, направленных на защиту кишечного барьера в условиях гипоксии, включая высотные экспедиции или патологические состояния, связанные с нарушением кислородного снабжения.

Ключевые слова: тканевые барьеры, плотные контакты, гипоксия, кишка, клаудины, вестерн-блоттинг, иммуногистохимия, камера Уссинга

DOI: 10.7868/S2658655X25110083

ВВЕДЕНИЕ

Кишечный эпителий с высокой интенсивностью осуществляет процессы реабсорбции и секреции ионов и органических соединений. Обязательным условием осуществления этих процессов является высокий уровень энергетического обмена в эпителиоцитах. В то же время кишечный эпителий функционирует в условиях уникального

кислородного градиента. Парциальное давление кислорода в подслизистой оболочке тощей кишки достигает 58 мм рт. ст., тогда как в полости кишки оно снижается до величины менее 3 мм рт. ст. [1], что подчеркивает критическую важность нормального уровня парциального давления кислорода в капиллярном русле. Гипоксия, развивающаяся вследствие снижения парциального давления кислорода, является существенным фактором регуляции функций эпителия кишки. На системном уровне это выражается в том, что при подъеме на высоту свыше 2000 м над уровнем моря часто наблюдается такое явление, как высотная болезнь, которая, помимо всего прочего, сопровождается расстройствами желудочно-кишечного тракта [2]. Данный факт указывает на наличие взаимосвязи между снижением кислородного снабжения и эффективностью барьерных функций кишечника.

Основной вклад в создание барьерных свойств кишки вносят плотные контакты между эпителиальными клетками, которые образованы преимущественно белками семейства клаудина, объединенными в функциональные кластеры [3, 4]. Особенности молекулярного строения изоформ этого семейства белков (структура внеклеточных петель (EC1/EC2) (заряд белка, его гидрофобность), трансмембранные домены и С-конец (взаимодействие с цитоскелетом)) лежат в основе их способности образовывать межклеточные поры или обеспечивать непроницаемость эпителия. Барьерные свойства эпителия зависят от их мозаики и уровня отдельных клаудинов [5]. Одним из ключевых белков, вносящих вклад в непроницаемость эпителиального слоя, является клаудин-1 [6, 7]. Другой представитель этого семейства, клаудин-2, формирует пору, по которой по межклеточному пути перемещаются ионы натрия и молекулы воды [8]. Благодаря этим свойствам и их различному распределению в плотных контактах эпителия клаудин-1 и -2 определяет специфику барьерных свойств сегментов желудочно-кишечного тракта [9].

Исследование изменений уровня и локализации белков плотных контактов, влияющих на барьерную функцию эпителия, остается актуальной и недостаточно изученной проблемой физиологии желудочно-кишечного тракта при гипоксии. В экспериментах на крысах с использованием модели ишемии-реперфузии подвздошной кишки было показано снижение ее барьерных свойств, которое сопровождалось уменьшением уровня клаудина-1 и -2 [10]. В толстой кишке в аналогичных условиях также обнаружено снижение уровня клаудина-1 [11]. Учитывая, что модель ишемии-реперфузии сегментов кишки представляет собой локально индуцируемую гипоксию и требует проведения оперативного вмешательства, для изучения поставленной цели была выбрана модель создания гипоксии в гипобарических условиях. Этот подход важен также тем, что позволяет понять клеточные и тканевые механизмы адаптации желудочно-кишечного тракта человека при его нахождении в условиях высокогорья. Для изучения гипоксии применяли моделируемый с помощью барокамеры подъем на высоту 3000 м над уровнем моря [12, 13], а также на высоту 6000 м [14]. В рамках данного исследования были изучены барьерные характеристики и уровень белков плотных контактов тканей тощей и толстой кишки крысы и оценен адаптационный потенциал такой модели гипоксического воздействия.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальные животные и схема эксперимента. В экспериментах использовали самцов крыс Вистар массой 180–200 г, $N = 40$ (здесь и далее N – количество животных, n – количество измерений), полученных из ЦКП “Биоколлекция” Института физиологии им. И.П. Павлова РАН. Животных содержали в клетках по четыре особи при фиксированной температуре и стандартном освещении (12 ч свет : 12 ч темнота). Животные получали стандартный рацион питания и воду *ad libitum*.

Дизайн эксперимента. Моделирование гипобарической гипоксии было проведено с использованием барокамеры “Табай” V-18 (Tabai, Япония). Было выбрано два режима создания гипобарической гипоксии. В первой серии опытов в камере создавали давление 530 мм рт. ст. (подъем на высоту 3000 м над уровнем моря), во второй серии давление было равно 370 мм рт. ст. (6000 м). Парциальное давление кислорода в этих условиях составляет около 110 и 70 мм рт. ст. соответственно [2]. Подъем на соответствующую высоту осуществляли со скоростью 10 м/с. На заданной высоте животное находилось в течение 3 ч, после чего осуществляли спуск с той же скоростью. Температура воздуха в камере поддерживалась на уровне 22–24 °С. При полной ишемии кровеносных сосудов кишки через один час происходят глубокие изменения в гистологии кишки, а после реперфузии в течение 24 ч наблюдается восстановление гистологической структуры стенки кишки [10]. Учитывая эти данные, а также методические особенности проведения опытов, дальнейшие экспериментальные процедуры проводили через 3 и 24 ч после возвращения в нормоксические условия. Первый срок рассматривали как результат гипоксического воздействия, а второй – как оценку адаптивного восстановления тканевого барьера после гипоксии.

Крысы были разделены на 5 групп в зависимости от условий проведения эксперимента: контрольная группа – работающая барокамера без герметизации и создания гипоксии ($N = 8$); крысы, подвергнутые гипоксии, соответствующей высоте 3000 м, взятые в эксперимент через 3 или 24 ч после завершения процедуры (группы “3 – 3000” ($N = 8$) и “24 – 3000” ($N = 8$) соответственно)); крысы, подвергнутые гипоксии, соответствующей высоте 6000 м, взятые в эксперимент через 3 или 24 ч после спуска (группы “3 – 6000” ($N = 8$) и “24 – 6000” соответственно ($N = 8$)). *Данный этап работы был выполнен на базе Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова.*

Электрофизиология. Исследование барьерных функций ткани толстой и тощей кишки проводили в камере Уссинга, которая с обеих сторон заполнялась раствором Кребса-Рингера по 5 мл (состав в ммоль/л: 119 NaCl; 5 KCl; 1.2 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$; 25 $NaHCO_3$; 0.4 $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$; 1.6 $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$; 1.2 $CaCl_2$) и оксигенировали карбогеном (95% O_2 , 5% CO_2). Температура в камере составляла 38 °С. В камере Уссинга регистрировали ток “короткого замыкания” и трансэпителиальное сопротивление (ТЭС), отражающие интенсивность активного транспорта и барьерные свойства эпителия соответственно. Для определения ТЭС ткани, отражающего проницаемость ткани для различных соединений и электролитов, регистрировали отклонение напряжения в режиме “фиксации тока” при величине тока 10 мкА. ТЭС рассчитывалось по закону Ома: $R = \Delta U / I$. Полученную величину нормировали на площадь исследуемого участка ткани (0.13 cm^2).

Образцы ткани для вестерн-блоттинга были заморожены при –80 °С; для проведения световой микроскопии образцы были зафиксированы в 10%-ном забуференном формалине.

Вестерн-блоттинг. Анализ уровня белков плотных контактов тощей и толстой кишки крыс был проведен с использованием метода вестерн-блоттинга в модификации Stain-Free [15]. Электрофорез проводили в 10%-ном полиакриламидном геле. Электроперенос выполняли полусухим методом с использованием PVDF мембраны (Bio-Rad, США). После блокировки в 5%-ном растворе обезжиренного сухого молока использовали кроличьи первичные антитела против: клаудина-1 и -2 (1 : 1000, Invitrogen, США); вторичные антитела козы антикроличьи, конъюгированные с пероксидазой хрена (1 : 2000, Cell Signaling Technology, США). Детекцию сигнала белков интереса выполняли с использованием ChemiDoc MP+ (Bio-Rad, США). Обработку результатов проводили в программе ImageLab 6.1 (Bio-Rad, США). Содержание клаудинов было нормализовано на общий белок в том же образце. Уровень белков в контрольных группах принят за 100%. *Данный этап работы был выполнен с использованием оборудования Ресурсного центра “Развитие молекулярных и клеточных технологий” Санкт-петербургского государственного университета.*

Световая микроскопия. После отмывки от 10%-ного забуференного формалина образцы проводили через ряд спиртов возрастающей концентрации (от 60° до 96°), ряд ксилолов и заключали в парафин “Гистомикс Экстра” (Биовитрум, Россия) при помощи заливочных столиков. Полученные с помощью микротомы Leica RM2265 (Leica, Германия) срезы толщиной 5 мкм помещали в водяную баню Leica HI1210 (Германия) в подогретую до 38 °C дистиллированную воду для расплавления, затем монтировали на предметные стекла, после чего оставляли на ночь в термостате при 37 °C для окончательной стабилизации срезов на стекле. На следующий день проводили процедуру депарафинизации ксилолом (2 × 5 мин; 22 °C). Удаление ксилола осуществлялось с помощью повторной инкубации в абсолютном спирте и проведением через спирты нисходящей концентрации (2 × 5 мин; 22 °C). После этого препараты отмывали в дистиллированной воде (2 × 5 мин; 22 °C). Срезы окрашивали гематоксилином Майера (20 мин; 22 °C), который обеспечивает окраску клеточных ядер красно-фиолетовым цветом. Последующая промывка стекол со срезами под проточной водой изменяла окраску срезов до сине-фиолетовой за счет создания слабощелочной среды. Далее следовала проводка в спиртах восходящей концентрации 70%, 80% и 96% (5 мин; 22 °C) и окраска эозином на спиртовой основе (5 мин; 22 °C). Монтаж покровных стекол на срезах осуществлялся при помощи Corbit-Balsam (Hecht, Германия). Оценку гистологической структуры ткани проводили на инвертированном световом микроскопе фирмы Leica DMI 6000 (Leica, Германия). Морфометрический анализ изображений проводили с помощью программы ImageJ (NIH, США).

Иммуногистохимия. Срезы тканей тощей и толстой кишки помещали на предметные стекла SuperFrostPlus (Thermo Scientific, США) для последующего исследования локализации клаудина-1 и -2. Перед нанесением антител срезы подвергались депарафинизации в ксилоле и дегидратации в батарее спиртов с нисходящими концентрациями. После промывки и кипячения в цитратном буфере (20 мин, 95 °C) (Биовитрум, Россия) стекла инкубировали в блокировочном растворе (10% БСА, 0.2% Triton-100). Для определения локализации белков плотных контактов стекла инкубировали с первичными кроличьими антителами к клаудину-1 и -2 (1 : 100, 4 °C, 24 ч). После промывки на срезы наносили вторичные козы антикроличьи антитела, конъюгированные с флуоресцентной меткой Alexa 555 (1 : 1000, 120 мин, 37 °). Для проведения негативного контроля на стекла со срезами тощей и толстой кишки после инкубации в блокирующем буфере наносили фосфатно-солевой буфер с 3% БСА и 0.2% Triton X-100, не содержащий первичных антител, с последующей инкубацией со вторичными антителами. Перед нанесением покровных стекол срезы инкубировали с красителем DAPI (Sigma-Aldrich, США) (1 : 5000, 5 мин, 22 °) для визуализации клеточных ядер, затем помещали в смесь глицерина и бидистиллированной воды (1 : 1) и запечатывали лаком. Анализ полученных изображений проводился с помощью лазерного конфокального сканирующего микроскопа Leica TCS SP5 (Leica, Германия). *Данный этап работы был выполнен с использованием оборудования Ресурсного центра “Развитие молекулярных и клеточных технологий” Санкт-петербургского государственного университета.*

Статистическая обработка результатов исследований. Оценку достоверности экспериментальных данных выполняли с помощью однофакторного дисперсионного анализа (One-way ANOVA) с поправкой Даннета в программе GraphPad Prism 8.2.1 (GraphPad, США). Уровень достоверности $p < 0.05$ принимали как статистически значимый. Данные представлены в виде среднего и стандартной ошибки среднего.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Гистоморфометрические изменения. При экспериментально вызванной гипоксии наблюдали изменение в гистологическом строении эпителиального слоя тощей и толстой кишки.

В тощей кишке через 3 ч после гипоксического воздействия длина ворсинок уменьшалась с 466 ± 7 в контрольной группе до 415 ± 13 в группе 3 – 3000 и до 391 ± 11 мкм в группе 3 – 6000 ($p < 0.01$ и $p < 0.001$ соответственно) (рис. 1f). В контрольной группе ширина ворсинок составляла 78 ± 1 мкм. У животных в группах 3 – 3000 и 3 – 6000 этот параметр достоверно увеличивался до 92 ± 3 и 118 ± 5 мкм соответственно ($p < 0.01$) (рис. 1g). У экспериментальных животных через 24 ч не происходило восстановления длины и ширины ворсинок до уровня контрольных значений. Существенные изменения обнаружены в размерах крипт тощей кишки. Глубина крипт увеличивалась во всех опытных группах, ширина – в группах 24 – 3000 и 3 – 6000 (рис. 1h). Ширина крипт достоверно увеличивалась в группах 24 – 3000 и 3 – 6000 (рис. 1i).

На основании морфометрических данных был высчитан коэффициент, отражающий соотношение высоты ворсинки к глубине крипты. Он составил для контрольной группы 6.1 ± 0.3 , уменьшаясь до величины 2.8 ± 0.1 в группе 3 – 3000 и 3.2 ± 0.2 в группе 3 – 6000. Через 24 ч коэффициент остался без изменений, то есть в экспериментальных группах не вернулся к величине контрольной группы.

В толстой кишке через 3 ч после гипоксии глубина крипт достоверно уменьшалась с 206 ± 5 в группе контроль до 186 ± 5 в группе 3 – 3000 и 169 ± 7 мкм в группе 3 – 6000 ($p < 0.05$ и $p < 0.001$ соответственно) (рис. 2f). При увеличении периода после проведенной гипоксии до 24 ч произошло возвращение к контрольным значениям только в группе 24 – 3000. В группе 24 – 6000 восстановления не обнаружено. Ширина крипт в контрольной группе составила 43 ± 1 мкм. Наблюдалось значимое снижение глубины крипт ($p < 0.001$) в группе 24 – 3000 и увеличение в группах 3 – 6000 и 24 – 6000 (рис. 2g).

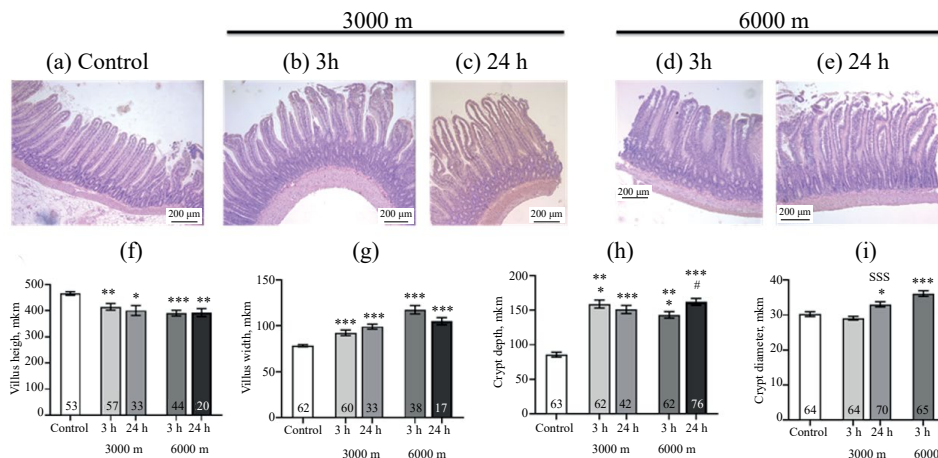


Рис. 1. Гистоморфометрические изменения ткани тощей кишки крысы через 3 и 24 ч после моделирования гипобарической гипоксии при подъеме на 3000 и 6000 м. (а) – Гистологическая структура стенки кишки контрольной группы. (б) – Гистологическая структура стенки кишки группы 3 – 3000. (с) – Гистологическая структура стенки кишки группы 24 – 3000. (д) – Гистологическая структура стенки кишки группы 3 – 6000. (е) – Гистологическая структура стенки кишки группы 24 – 6000. (f–i) – Морфометрические параметры. В столбцах указано количество измерений. Окраска гематоксилин-эозином. Шкала – 200 мкм. Увеличение – 20 $\times$. * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$ в сравнении с контролем; \$\$\$ – $p < 0.001$ в сравнении с группой 3 – 3000; # – $p < 0.05$, ### – $p < 0.001$ в сравнении с группой 3 – 6000.

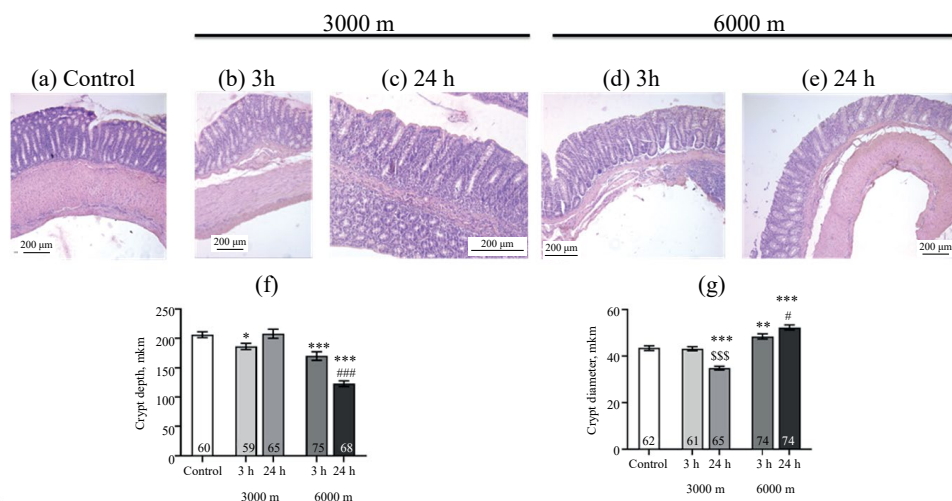


Рис. 2. Гистоморфометрические изменения ткани толстой кишки крысы через 3 и 24 ч после моделирования гипобарической гипоксии при подъеме на 3000 и 6000 м. (а) – Гистологическая структура стенки кишки контрольной группы. (б) – Гистологическая структура стенки кишки группы 3 – 3000. (с) – Гистологическая структура стенки кишки группы 24 – 3000. (д) – Гистологическая структура стенки кишки группы 3 – 6000. (е) – Гистологическая структура стенки кишки группы 24 – 6000. (f, g) – Морфометрические параметры. В столбцах указано количество измерений. Окраска гематоксилин-эозином. Шкала – 200 мкм. Увеличение – 20×. * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$ в сравнении с контролем; \$\$\$ – $p < 0.001$ в сравнении с группой 3 – 3000; # – $p < 0.05$, ### – $p < 0.001$ в сравнении с группой 3 – 6000.

Характеристика тканевого барьера. В тощей кишке в группах 3 – 3000 (количество сегментов ткани = 19) и 3 – 6000 (количество сегментов ткани = 20) достоверно увеличивался ток “короткого замыкания” относительно контрольной группы (количество сегментов ткани = 18) на 39% и 30% соответственно ($p < 0.05$) (рис. 3а). Увеличение периода после воздействия до 24 ч приводило в группах 24 – 3000 и 24 – 6000 к восстановлению этого параметра до контрольных значений. ТЭС оставалось постоянным во всех группах (рис. 3б).

В толстой кишке в группах 3 – 3000 (количество сегментов ткани = 20) и 3 – 6000 (количество сегментов ткани = 15) обнаружено увеличение тока “короткого замыкания” почти в три раза по сравнению с контрольной группой (количество сегментов ткани = 20); ($p < 0.01$ и $p < 0.05$ соответственно) (рис. 3с). Одновременно в этих группах достоверно снижалось ТЭС ($p < 0.05$) (рис. 3д). Через 24 ч после воздействия гипоксии регистрировали восстановление значений тока “короткого замыкания” и ТЭС, но только в группе 24 – 3000. В группе 24 – 6000 восстановления величины тока “короткого замыкания” и трансэпителиального сопротивления не происходило (рис. 3с, д).

Уровень белков плотных контактов. Уровень клаудина-1 в тощей кишке при действии гипоксии не изменялся (рис. 4а). Содержание клаудина-2 в экспериментальных группах 3 – 3000 и 3 – 6000 достоверно уменьшалось с последующим восстановлением через 24 ч ($p < 0.05$) (рис. 4б).

В толстой кишке через 3 ч после подъема на 3000 м уменьшался уровень клаудина-1, который восстанавливался через 24 ч (рис. 4с). В группе 3 – 6000 уровень клаудина-1 не изменялся, однако через 24 ч после подъема было обнаружено его снижение ($p < 0.05$). Уровень клаудина-2 в экспериментальных группах не изменялся (рис. 4д).

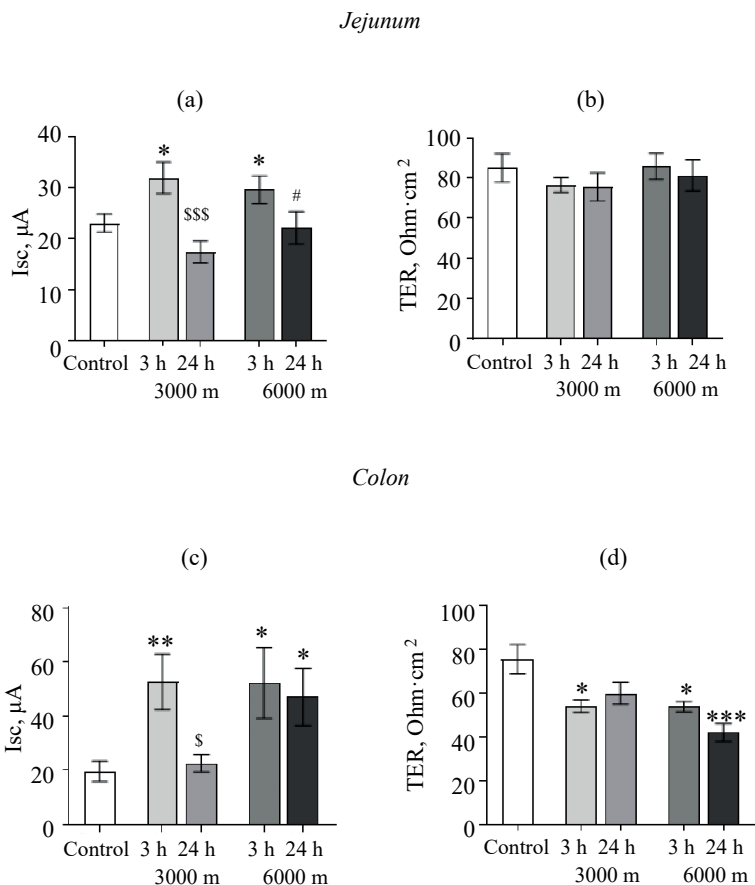


Рис. 3. Изменение барьерных свойств в тощей и толстой кишке крыс через 3 и 24 ч после моделирования гипобарической гипоксии при подъеме на 3000 и 6000 м. (а, с) – Ток “короткого замыкания” (I_{sc}) и (b, d) – трансэпителиальное сопротивление (TER). * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$ в сравнении с контролем; \$\$\$ – $p < 0.001$ в сравнении с группой 3 – 3000; # – $p < 0.05$ в сравнении с группой 3 – 6000.

Локализация белков плотных контактов. По данным иммуногистохимии можно сделать вывод о том, что моделирование условий гипобарической гипоксии не влияло на локализацию клаудина-1 и -2 в плазматической мембране. Белки локализуются в апико-латеральной зоне клеток без распределения в цитоплазме (рис. 5).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные результаты свидетельствуют, что моделирование условий кратковременной гипобарической гипоксии, соответствующей подъему на высоту 3000 и 6000 м, вызывает изменение свойств кишечного барьера крыс. Изменения происходят на гистологическом, функциональном и молекулярном уровне сегмент-специфическим образом, то есть существуют значимые отличия в происходящих процессах в тощей и толстой кишке. Известно, что эпителиоциты, которые абсорбируют ионы натрия, расположены на поверхности ворсинок тощей кишки, а также на поверхности

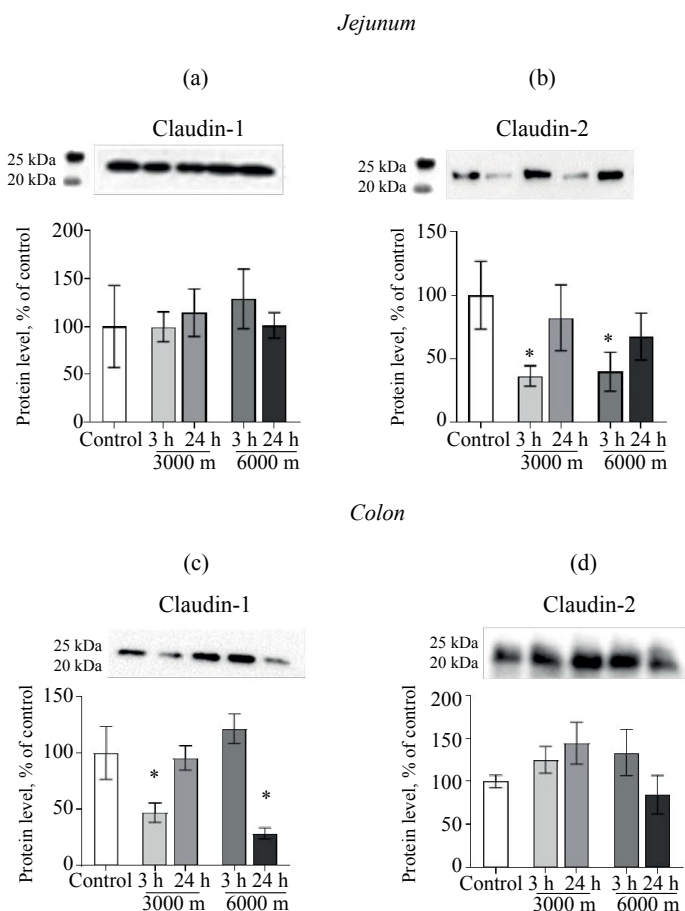


Рис. 4. Изменение уровня клаудина-1 и -2 в тощей и толстой кишке крысы через 3 и 24 ч после моделирования гипобарической гипоксии при подъеме на 3000 и 6000 м. Сверху над гистограммами представлены репрезентативные иммуноблоты; $n = 4$ для каждой группы; * – $p < 0.05$ в сравнении с контролем.

слизистой толстой кишки. В то же время эпителиальные клетки крипт секретируют в просвет кишки ионы хлора [16]. Коэффициент, отражающий соотношение высоты ворсинки к глубине крипты, свидетельствует о перераспределении площадей всасывания и секреции ионов в кишке и является одним из критериев развития секреторной диареи [17, 18]. Гистоморфометрический анализ ткани кишки и величина этого коэффициента показывают, что на морфологическом уровне наблюдаются изменения, характерные для развития секреторной диареи.

Электрофизиологические показатели подтверждают развитие данной дисфункции кишки в наших экспериментальных условиях. Ток “короткого замыкания” рассматривают как показатель, определяющий величину активного транспорта через эпителий [19]. В обоих сегментах кишки наблюдали его увеличение, что свидетельствует об усилении процессов перераспределения ионов в слизистой оболочке. В свою очередь, ТЭС является параметром, величина которого дает характеристику межклеточной проницаемости. В тощей кишке этот показатель не изменился, в то время как в толстой кишке после действия гипоксии сопротивление уменьшается, указывая на увеличение

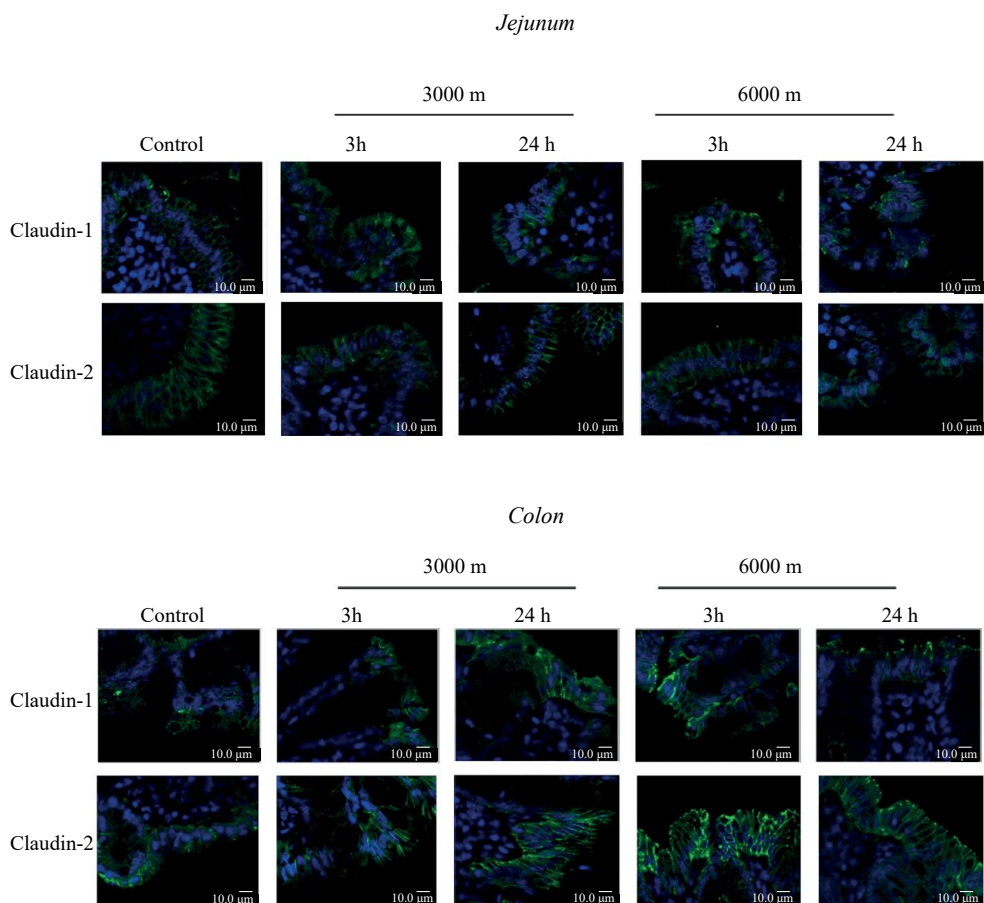


Рис. 5. Распределение клаудина-1 и -2 в тощей и толстой кишке крысы через 3 и 24 ч после моделирования гипобарической гипоксии при подъеме на 3000 и 6000 м. Зеленое свечение – клаудин-1 и клаудин-2; синее свечение – окраска ядер флуоресцентным красителем DAPI. Масштабная линейка – 10 мкм.

межклеточной диффузии ионов. Различие в изменении ТЭС отражает сегмент-специфичность реакции этих сегментов кишки на гипоксию.

Такое же заключение можно сделать, анализируя изменение уровня клаудинов в тощей и толстой кишке. В тощей кишке изменения обнаружены в уровне клаудина-2, в толстой – клаудина-1. Среди молекулярных механизмов влияния гипоксии на барьерные свойства кишечника важную роль играет индуцируемый гипоксией фактор (HIF), который является основным фактором транскрипции, ответственным за регулирование клеточного ответа на изменения напряжения кислорода [20]. Ранее было показано, что ген клаудина-1 является целевым для HIF: при повышении HIF происходит увеличение этого белка [21]. При наличии такой взаимосвязи стоит ожидать однонаправленные изменения клаудина-1 при гипоксии в проводимых экспериментах. Однако эти данные различаются: в толстой кишке происходило снижение уровня клаудина-1, тогда как в тощей кишке он не изменялся. Возможно, что это связано с сегмент-специфическим распределением HIF. Дифференциальная регуляция экспрессии HIF вдоль продольных осей кишечника может быть определяющим фактором адаптивного ответа на вызванное гипоксией повреждение кишечника [20]. Показано, что экспрессия гена одного из ключевых ферментов

(пролил-4-гидроксилаза) поддержания уровня HIF увеличивается по направлению к дистальному концу желудочно-кишечного тракта [22]. Однако, как изменяется HIF в наших экспериментальных условиях неизвестно, что требует проведения специального анализа.

Одним из самых ранних ответов на гипоксию является изменение активности Na,K-АТФазы [23], причем в кишке активность Na,K-АТФазы в условиях гипоксии снижается [24]. Было показано функциональное взаимодействие между Na,K-АТФазой и уровнем клаудинов в ткани кишки, предположительно, в результате образования комплекса убаин/Na,K-АТФаза и далее реализуемое через Src-киназу [25]. Поскольку Src-киназа также чувствительна к условиям гипоксии [26], можно предположить вовлечение Na,K-АТФазы как клеточного посредника в изменение уровня белков плотных контактов при гипоксии. Косвенно это подтверждается увеличением в наших условиях тока “короткого замыкания”, отражающего интенсивность активного транспорта ионов [27]. Кроме того, это предположение подтверждается и данными о влиянии HIF на экспрессию кавеолина [28], который является структурным белком специализированных микродоменов плазматической мембраны кавеол, играющих важную роль в осуществлении функций Na,K-АТФазы [29]. Анализ экспрессии генома показал, что кавеолин увеличивается в мышинных моделях при активации сигнализации HIF в толстой кишке. Гипоксическая индукция кавеолина была необходима для целостности кишечного барьера за счет регуляции экспрессии белков плотных контактов [28]. Таким образом, изменение уровня других молекулярных компонентов плотных контактов, в частности клаудина-2, может являться результатом активации различных сигнальных путей в клетке, запускаемых гипоксией.

Чувствительность толстой кишки к условиям гипоксии может быть связана с наличием в просвете толстой кишки микроорганизмов, чувствительных к кислороду. Так, было показано, что уже в условиях слабой гипоксии (3000 м) через 3 ч достоверно увеличивается уровень анаэробных бактерий и снижается количество аэробных в болюсах из толстой кишки крыс [30]. Известно, что бактерии расщепляют пищевые компоненты, в результате чего образуются различные короткоцепочечные жирные кислоты [31]. Было показано, что при воспалительном процессе бутират усиливает кишечный барьер [32]. Однако при его повышенных концентрациях, напротив, обладает токсичным эффектом, нарушая барьерные свойства эпителия [33]. Таким образом, можно предположить, что изменение состава микробиоты при гипоксии и, соответственно, концентрации короткоцепочечных жирных кислот может вносить вклад в изменение кишечного барьера.

Через 24 ч после моделирования условий подъема на высоту 3000 и 6000 м не происходило восстановления морфологических параметров в ткани тощей и толстой кишки. Однако на уровне функциональных показателей признаки адаптации ткани кишки были обнаружены. Через 24 ч после относительно слабой (3000 м) гипоксии молекулярные изменения в плотных контактах в тощей и толстой кишке отсутствовали, что в совокупности с электрофизиологическими данными подчеркивает восстановление функций эпителия к этому сроку после воздействия гипоксии. При более выраженной гипоксии (6000 м) адаптационные процессы отмечаются только в ткани тощей кишки. Толстая кишка оказалась более чувствительной к этим условиям гипоксии: через 24 ч восстановления ее функций не происходило. Полученные данные показывают необходимость учета состояния тканевого барьера для подходов, которые направлены на предотвращение секреторной диареи при подъемах человека на высоту, в частности, такие как включение пробиотиков в пищу или гипоксическое прекондиционирование.

Таким образом, гипоксия вызывает комплексные изменения в слизистой оболочке тощей и толстой кишки крысы, которые включают в себя морфологические и функциональные изменения эпителиального слоя, свидетельствующие о сегмент-специфическом нарушении тканевого барьера. Увеличение срока после гипоксии приводит к восстановлению в первую очередь эпителиального барьера, однако развитие адаптационных изменений в тощей и толстой кишке крысы различно.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаем благодарность сотруднику Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова к.м.н. В.О. Матыщину за помощь в проведении опытов в гипобарической камере, а также к.б.н. Ливановой А.С. за помощь при проведении экспериментов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (А. Г. М., И. И. К., А. А. Ф.), сбор данных (А. А. Ф., Д. Д. Г., А. Е. Б., В. В. К.), обработка данных (А. Г. М., А. А. Ф., Д. Д. Г., А. Е. Б.), написание и редактирование манускрипта (А. Г. М., И. И. К., А. А. Ф.).

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 18-15-00043).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям Этического комитета по животным Санкт-Петербургского государственного университета. Протокол эксперимента одобрен Этическим комитетом в области исследований на животных Санкт-Петербургского государственного университета (Протокол № 131-03-12 от 8 января 2024 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Singhal R, Shah YM* (2020) Oxygen battle in the gut: Hypoxia and hypoxia-inducible factors in metabolic and inflammatory responses in the intestine. *J Biol Chem* 295: 10493–10505. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV120.011188>
2. *Gallagher SA, Hackett PH* (2004) High-altitude illness. *Emerg Med Clin North Am* 22: 329–355. <https://doi.org/10.1016/j.emc.2004.02.001>
3. *Markov AG, Aschenbach JR, Amasheh S* (2015) Claudin clusters as determinants of epithelial barrier function. *IUBMB Life* 67: 29–35. <https://doi.org/10.1002/iub.1347>
4. *Ivanov AI* (2012) Structure and regulation of intestinal epithelial tight junctions: current concepts and unanswered questions. *Adv Exp Med Biol* 763: 132–148. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4711-5_6
5. *Amasheh S, Milatz S, Krug SM, Markov AG, Günzel D, Amasheh M, Fromm M* (2009) Tight Junction Proteins as Channel Formers and Barrier Builders: Claudin-2,-5, and -8. *Ann N Y Acad Sci* 1165: 211–219. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04439.x>
6. *Inai T, Kobayashi J, Shibata Y* (1999) Claudin-1 contributes to the epithelial barrier function in MDCK cells. *Eur J Cell Biol* 78: 849–855. [https://doi.org/10.1016/S0171-9335\(99\)80086-7](https://doi.org/10.1016/S0171-9335(99)80086-7)
7. *Günzel D, Fromm M* (2012) Claudins and other tight junction proteins. *Compr Physiol* 2: 1819–1852. <https://doi.org/10.1002/cphy.c110045>

8. Rosenthal R, Milatz S, Krug SM, Oelrich B, Schulzke JD, Amasheh S, Günzel D, Fromm M (2017) Claudin-2-mediated cation and water transport share a common pore. *Acta Physiol* 219: 521–536. <https://doi.org/10.1111/apha.12742>
9. Markov AG, Veshnyakova A, Fromm M, Amasheh M, Amasheh S (2010) Segmental expression of claudin proteins correlates with tight junction barrier properties in rat intestine. *J Comp Physiol B* 180: 591–598. <https://doi.org/10.1007/s00360-009-0440-7>
10. Inoue K, Oyamada M, Mitsufuji S, Oyamada M, Takamatsu T (2006) Different changes in the expression of multiple kinds of tight-junction proteins during ischemia-reperfusion injury of the rat ileum. *Acta Histochem Cytochem* 39: 35–45. <https://doi.org/10.1267/ahc.05048>
11. Li Q, Zhang Q, Wang M, Zhao S, Ma J, Luo N, Li N, Li Y, Xu G, Li J (2009) Altered distribution of tight junction proteins after intestinal ischaemia/reperfusion injury in rats. *J Cell Mol Med* 13: 4061–4076. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2009.00975.x>
12. Kravtsova VV, Fedorova AA, Tishkova MV, Livanova AA, Matytsin VO, Ganapolsky VP, Vetrovoy OV, Krivoi II (2022) Short-Term Mild Hypoxia Modulates Na,K-ATPase to Maintain Membrane Electrogenesis in Rat Skeletal Muscle. *Int J Mol Sci* 23: 11869. <https://doi.org/10.3390/ijms231911869>
13. Kravtsova VV, Ganke DD, Tishkova MV, Saburova EA, Matytsin VO, Krivoi II (2024) Short-Term Hypobaric Hypoxia Isoform-Specifically Protects Rat Skeletal Muscle Na,K-ATPase from Disuse-Induced Dysfunction. *J Evol Biochem Physiol* 60(5): 1712–1724. <https://doi.org/10.1134/s0022093024050053>
14. Кравцова ВВ, Федорова АА, Матыцин ВО, Ганке ДД, Ветровой ОВ, Кривой ИИ (2025) Кратковременная моделируемая высокогорная гипоксия повышает эффективность Na,K-АТФазы в поддержании электрогенеза диафрагмы крысы. *Бюл эксп биол мед: в печати*. [Kravtsova VV, Fedorova AA, Matytsin VO, Ganke D, Vetrovoy OV, Krivoi II (2025) Short-term simulated high-altitude hypoxia increases the efficiency of Na,K-ATPase in maintaining the electrogenesis of the rat diaphragm. *Bull Exp Biol Med: In Press*. (In Russ)].
15. Maloy A, Dmitriev RI, Papkovsky DB (2022) Stain-Free total-protein normalization enhances the reproducibility of Western blot data. *Anal Biochem* 654: 114840. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2022.114840>
16. Donowitz M, Sarker R, Lin R, McNamara G, Tse CM, Singh V (2022) Identification of intestinal NaCl absorptive-anion secretory cells: potential functional significance. *Front Physiol* 13: 892112. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.892112>
17. Thiagarajah JR, Kamin DS, Acra S, Goldsmith JD, Roland JT, Lencer WI, Muise AM, Goldenring JR, Avitzur Y, Martin MG, PediCODE Consortium (2018) Advances in evaluation of chronic diarrhea in infants. *Gastroenterology* 154: 2045–2059. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.03.067>
18. Taavela J, Viiri K, Välimäki A, Sarin J, Salonoja K, Mäki M, Isola J (2021) Apolipoprotein A4 defines the villus-crypt border in duodenal specimens for celiac disease morphometry. *Front Immunol* 12: 713854. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.713854>
19. Gondzik V, Awayda MS (2011) Methods for stable recording of short-circuit current in a Na⁺-transporting epithelium. *Am J Physiol Cell Physiol* 301: C162–C170. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00459.2010>
20. Nishie H, Takahashi T, Inoue K, Shimizu H, Morimatsu H, Toda Y, Omori E, Akagi R, Katayama H, Morita K (2009) Site-specific induction of intestinal hypoxia-inducible factor-1 α after hemorrhagic shock. *Mol Med Rep* 2: 149–152. <https://doi.org/10.3892/mmr.00000075>
21. Saeedi BJ, Kao DJ, Kitzenberg DA, Dobrinskikh E, Schwisow KD, Masterson JC, Kendrick AA, Kelly CJ, Bayless AJ, Kominsky DJ, Campbell EL, Kuhn KA, Furuta GT, Colgan SP, Glover LE (2015) HIF-dependent regulation of claudin-1 is central to intestinal epithelial tight junction integrity. *Mol Biol Cell* 26: 2252–2262. <https://doi.org/10.1091/mbc.E14-07-1194>

22. Dengler F, Sova S, Salo AM, Mäki JM, Koivunen P, Myllyharju J (2021) Expression and roles of individual HIF prolyl 4-hydroxylase isoenzymes in the regulation of the hypoxia response pathway along the murine gastrointestinal epithelium. *Int J Mol Sci* 22: 4038.
<https://doi.org/10.3390/ijms22084038>
23. Bogdanova A, Petrushanko IY, Hernansanz-Agustín P, Martínez-Ruiz A (2016) “Oxygen Sensing” by Na,K-ATPase: These Miraculous Thiols. *Front Physiol* 7: 314.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00314>
24. Archontakis-Barakakis P, Mavridis T, Chlorogiannis DD, Barakakis G, Laou E, Sessler DI, Gkio-kas G, Chalkias A (2025) Intestinal oxygen utilisation and cellular adaptation during intestinal ischaemia-reperfusion injury. *Clin Transl Med*. 15(1): e70136.
<https://doi.org/10.1002/ctm2.70136>
25. Markov AG, Fedorova AA, Kravtsova VV, Bikmurzina AE, Okorokova LS, Matchkov VV, Cornelius V, Amasheh S, Krivoi II (2020) Circulating Ouabain Modulates Expression of Claudins in Rat Intestine and Cerebral Blood Vessels. *Int J Mol Sci* 21: 5067.
<https://doi.org/10.3390/ijms21145067>
26. Christidis P, Vij A, Petousis S, Ghaemmaghami J, Shah BV, Koutroulis I, Kratimenos P (2022) Neuroprotective effect of Src kinase in hypoxia-ischemia: A systematic review. *Front Neurosci* 16: 1049655.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2022.1049655>
27. Karaki SI (2023) A Technique of Measurement of Gastrointestinal Luminal Nutrient Sensing and These Absorptions: Ussing Chamber (Short-Circuit Current) Technique. *J Nutr Sci Vitaminol* 69: 164–175.
<https://doi.org/10.3177/jnsv.69.164>
28. Xie L, Xue X, Taylor M, Ramakrishnan SK, Nagaoka K, Hao C, Gonzalez FJ, Shah YM (2014) Hypoxia-inducible factor/MAZ-dependent induction of caveolin-1 regulates colon permeability through suppression of occludin, leading to hypoxia-induced inflammation. *Mol Cell Biol* 34: 3013–3023.
<https://doi.org/10.1128/MCB.00324-14>
29. Junghans C, Vukojević V, Tavrız NN, Maksimov EG, Zuschratter W, Schmitt FJ, Friedrich T (2017) Disruption of Ankyrin B and Caveolin-1 Interaction Sites Alters Na⁺,K⁺-ATPase Membrane Diffusion. *Biophys J* 113: 2249–2260.
<https://doi.org/10.1016/j.bpj.2017.08.053>
30. Maity C, Lahiri P, Adak A, Ghosh K, Pati BR, Mondal KC (2013) Hypobaric-hypoxia induces alteration in microbes and microbes-associated enzyme profile in rat colonic samples. *Biomed Environ Sci* 26: 869–873.
<https://doi.org/10.3967/bes2013.013>
31. Macfarlane S, Macfarlane GT (2003) Regulation of short-chain fatty acid production. *Proc Nutr Soc* 62: 67–72.
<https://doi.org/10.1079/PNS2002207>
32. Yan H, Ajuwon KM (2017) Butyrate modifies intestinal barrier function in IPEC-J2 cells through a selective upregulation of tight junction proteins and activation of the Akt signaling pathway. *PLoS One* 12: e0179586.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179586>
33. Peng L, He Z, Chen W, Holzman IR, Lin J (2007) Effects of butyrate on intestinal barrier function in a Caco-2 cell monolayer model of intestinal barrier. *Pediatr Res* 61: 37–41.
<https://doi.org/10.1203/01.pdr.0000250014.92242.f3>

Changes in Barrier Properties of the Rat Jejunum and Colon after Hypobaric Hypoxia

A. A. Fedorova^a, D. D. Ganke^a, A. E. Bikmurzina^a, V. V. Kravtsova^a, I. I. Krivoi^a,
and A. G. Markov^{a, b, *}

^a*Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia*

^b*Pavlov Institute of Physiology of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia*

^{*}*e-mail: a.markov@spbu.ru*

Barrier properties of intestinal epithelium play an important role in maintaining homeostasis, but become vulnerable in case of oxygen deficiency. In this work, the effect of hypobaric hypoxia (altitudes of 3000 and 6000 m) on the morphological parameters and barrier function of the small and large intestines of rats was investigated. The experiments were carried out using a pressure chamber and included histological analysis, electrophysiological measurements in a Ussing chamber, assessment of the level of tight junction proteins (claudins-1 and -2) by Western blot and their localization by immunohistochemistry. It was found that hypobaric hypoxia causes segment-specific changes in morphometric parameters, barrier characteristics and the level of claudins. In the jejunum, the structure of the villi was disrupted and the level of claudin-2 decreased, in the colon, the depth of crypts changed, the level of claudin-1 and transepithelial resistance decreased. Partial recovery of functions was observed 24 h after exposure to hypoxia (3000 m), whereas no adaptation in the colon occurred after exposure to more severe hypoxia (6000 m). The data obtained highlight the high sensitivity of the intestinal barrier to hypoxic stress and its different response depending on the anatomical segment. The results may be useful in developing preventive strategies aimed at protecting the intestinal barrier under hypoxic conditions, including high-altitude expeditions or pathological conditions associated with impaired oxygen supply.

Keywords: tissue barrier, tight junction, hypoxia, intestine, claudins, western blot, immunohistochemistry, Ussing chamber