

Аннотация научных трудов

профессора А.Г. Маркова и профессора И.И. Кривого кафедры общей физиологии биологического факультета Санкт-Петербургского государственного университета, выдвигаемых на конкурс на присуждение премии за научные труды, присуждаемые Санкт-Петербургским государственным университетом в категории «За фундаментальные достижения в науке» на тему

«Молекулярное разнообразие и функциональное взаимодействие Na,K-АТФазы и клаудинов»

Успехи молекулярно-биологических методов исследования, демонстрирующих существование одного и того же белка в виде множественных молекулярных форм, во многом опережают знания о выполняемых ими функциях. Исследования в этой области относятся к новейшим и перспективным направлениям молекулярной физиологии и биомедицины. Именно на выявлении таких новых механизмов физиологических функций основаны современные стратегии поиска эффективных лекарственных препаратов и путей коррекции различных патологических состояний. Выявление молекулярных механизмов нарушений открывает новые перспективы для поиска методов их профилактики и коррекции – проблем, востребованных в современной медицине и экологии человека.

Интегральные белки плазматической мембраны, обеспечивающие процессы трансмембранного (Na,K-АТФаза) и межклеточного (клаудины) транспорта относятся к витальным, необходимым для жизнеобеспечения человека и животных. Na,K-АТФаза поддерживает ионный баланс, электрогенез и возбудимость, а также ряд сопряженных транспортных систем клеток. Белки семейства клаудинов входят в состав структуры плотных контактов и являются основными молекулярными детерминантами, определяющими парацеллюлярную проницаемость и барьерные свойства эпителия. Нарушения функционирования этих белков приводят к тяжелым последствиям вплоть до летального исхода. Проблема изучения механизмов подобных нарушений осложнена молекулярным разнообразием и ткане-специфичностью экспрессии этих белков.

Профессор А.Г.Марков и профессор И.И.Кривой - признанные лидеры в исследовании молекулярной и функциональной гетерогенности вышеуказанных транспортных белков, причем не только в России, но и за ее пределами. Данная проблема, совместно разрабатываемая ими уже более 10 лет, была поддержана на начальном этапе грантами СПбГУ и РФФИ, что позволило создать серьезный теоретический и экспериментальный задел. В течение 2015-2019 г. эти исследования были продолжены с применением широкого спектра современных методов, клеточных культур, а также линий лабораторных животных – экспериментальных моделей ряда функциональных нарушений, актуальных для медицины и экологии человека.

Получены новые приоритетные фундаментальные данные, свидетельствующие, что функциональная гетерогенность Na,K-АТФазы и клаудинов обусловлена не только их молекулярным разнообразием, но также специфической мембранной локализацией, особенностями регуляции и взаимодействием с белковым и липидным окружением, способностью образовывать мультимолекулярные функциональные комплексы (принцип кластерной организации). Важнейшим достижением коллектива авторов стало выявление в условиях *in vivo* функционального взаимодействия Na,K-АТФазы и клаудинов, которое можно рассматривать как новый механизм регуляции структуры плотных контактов и парацеллюлярного транспорта эндогенными циркулирующими дигиталисоподобными лигандами Na,K-АТФазы. На моделях эндотоксемии и микрогравитации установлен протектирующий эффект этого взаимодействия.

Предполагается, что полученные результаты могут быть в перспективе использованы при разработке новых способов профилактики и коррекции двигательных расстройств, отеков

головного мозга, воспалительных заболеваний кишки, а также в авиационной и космической медицине (проблемы адаптации к невесомости).

Все исследования проведены под непосредственным руководством А.Г. Маркова и И.И. Кривого на базе СПбГУ, а также в тесном сотрудничестве с лабораториями Москвы, Казани, Германии, Дании, Швеции и США и Университетами-партнерами СПбГУ - Свободным университетом Берлина и Университетом г. Орхус, Дания.

Результаты исследований за период с 2015 по 2019 г. были опубликованы в 23 статьях в высокорейтинговых журналах, индексируемых в реферативно-библиографических базах данных Web of Science Core Collection и Scopus, из них 16 статей в журналах квартиля Q1.

Данное научное направление неоднократно подвергалось тщательной экспертной оценке, что выразилось в его поддержке разными научными фондами – 1 грант РНФ, 5 грантов РФФИ, 4 совместных гранта СПбГУ и Свободного университета Берлина.

В ходе выполнения научно-исследовательской работы под руководством профессоров А.Г. Маркова и И.И. Кривого были защищены 3 ВКР бакалавров, 6 ВКР магистров, 3 кандидатские и 1 докторская диссертации.

Аннотации статей

представлены в соответствии с порядком расположения статей в Перечне научных трудов
(английский и русский варианты)

1)

Critical Review

Claudin Clusters as Determinants of Epithelial Barrier Function



Alexander G. Markov¹
Jörg R. Aschenbach²
Salah Amasheh^{2*}

¹Department of General Physiology, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

²Institute of Veterinary Physiology, Department of Veterinary Medicine, Freie Universität Berlin, Berlin, Germany

Abstract

Claudins are tetraspan tight junction proteins which have been attributed to primarily determine epithelial barrier function in a wide variety of different organs and tissues. Among this protein family with currently 27 members, single claudins contribute in an organ- and tissue-specific manner to defined properties such as cation-, anion- or water-selective pore functions, sealing functions or ambiguous functions. As the size of tight junction strand particles visualized by freeze-fracture electron microscopy have a diameter of approximately 10 nm, multimeric assembly of tight junction proteins appears to be a basic principle for barrier formation. Moreover, expression

patterns of different tissues showed that single claudins appear to specifically co-localize with other claudins, which indicates a cluster formation within tight junction strand particles with a fixed stoichiometry. This review provides a critical view on the current understanding of tight junction protein co-localization within strands. We analyze how tissue specific differences of claudin functions could be dependent on their specific partners for barrier formation. Furthermore, a model of claudin clusters as structural and functional units within tight junction strands is provided. © 2015 IUBMB Life, 00(00):000–000, 2015

Аннотация

Клаудины представляют собой белки плотных контактов, которые, как считается, в первую очередь определяют функцию эпителиального барьера в большом количестве различных органов и тканей. Среди этого семейства белков, насчитывающего в настоящее время 27 членов, одиночные клаудины вносят специфический для органа и ткани характер распределения и имеют определенные свойства, такие как селективность по катионам, анионам или воде, функции пор, герметизирующие функции или еще не определенные функции. Поскольку размер частиц нитей плотных контактов, видимые с помощью электронной

микроскопии при замораживании-скалывании, имеет диаметр приблизительно 10 нм, мультимерная сборка белков с плотным контактом, по-видимому, является основным принципом для образования барьера. Более того, паттерны экспрессии в разных тканях показали, что одиночные клаудины, по-видимому, специфически ко-локализуются с другими клаудинами, что указывает на формирование кластера в частицах плотно соединенных цепей с фиксированной стехиометрией. Этот обзор дает критический взгляд на текущее понимание колокализации белков плотных соединений внутри цепей. Мы анализируем, как тканеспецифические различия функций клаудина могут зависеть от их конкретных партнеров для формирования барьера. Кроме того, предоставляется модель кластера клаудинов как структурных и функциональных единиц в пределах структуры плотных контактов.

Specialized Functional Diversity and Interactions of the Na,K-ATPase

Vladimir V. Matchkov¹ and Igor I. Krivoi^{2*}

¹ Department of Biomedicine, Aarhus University, Aarhus, Denmark, ² Department of General Physiology, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

Na,K-ATPase is a protein ubiquitously expressed in the plasma membrane of all animal cells and vitally essential for their functions. A specialized functional diversity of the Na,K-ATPase isozymes is provided by molecular heterogeneity, distinct subcellular localizations, and functional interactions with molecular environment. Studies over the last decades clearly demonstrated complex and isoform-specific reciprocal functional interactions between the Na,K-ATPase and neighboring proteins and lipids. These interactions are enabled by a spatially restricted ion homeostasis, direct protein-protein/lipid interactions, and protein kinase signaling pathways. In addition to its “classical” function in ion translocation, the Na,K-ATPase is now considered as one of the most important signaling molecules in neuronal, epithelial, skeletal, cardiac and vascular tissues. Accordingly, the Na,K-ATPase forms specialized sub-cellular multimolecular microdomains which act as receptors to circulating endogenous cardiotonic steroids (CTS) triggering a number of signaling pathways. Changes in these endogenous cardiotonic steroid levels and initiated signaling responses have significant adaptive values for tissues and whole organisms under numerous physiological and pathophysiological conditions. This review discusses recent progress in the studies of functional interactions between the Na,K-ATPase and molecular microenvironment, the Na,K-ATPase-dependent signaling pathways and their significance for diversity of cell function.

Аннотация

Na,K-АТФаза - это белок, экспрессирующийся в плазматической мембране всех клеток животных и жизненно необходимый для их функций. Специализированное функциональное разнообразие изоферментов Na,K-АТФазы обеспечивается молекулярной гетерогенностью, различной субклеточной локализацией и функциональными взаимодействиями с молекулярным окружением. Исследования последних десятилетий ясно продемонстрировали сложные и изоформ-специфичные реципрокные функциональные взаимодействия между Na,K-АТФазой и соседними белками и липидами. Эти взаимодействия возможны благодаря пространственно ограниченному ионному гомеостазу, прямым белок-белок/липид взаимодействиям и сигнальным путям, реализуемым протеинкиназами. В дополнение к своей «классической» функции транслокации ионов, Na,K-АТФаза является одной из наиболее важных сигнальных молекул в нейрональных, эпителиальных, скелетных, сердечных и сосудистых тканях. Na,K-АТФаза образует специализированные субклеточные мульти-молекулярные микродомены, которые действуют как рецепторы для циркулирующих эндогенных кардиотонических стероидов (КТС), запуская ряд сигнальных путей. Изменения уровня эндогенных кардиотонических стероидов и инициированные сигнальные реакции имеют важное адаптивное значение для тканей и организма в целом в разнообразных физиологических и патофизиологических условиях. В данном обзоре обсуждается прогресс в исследовании функциональных взаимодействий между Na,K-АТФазой и молекулярным микроокружением, связанными с Na,K-АТФазой сигнальными путями и их значения для разнообразных клеточных функций.

3) Distinct $\alpha 2$ Na,K-ATPase membrane pools are differently involved in early skeletal muscle remodeling during disuse

Violetta V. Kravtsova,¹ Alexey M. Petrov,² Vladimir V. Matchkov,³ Elena V. Bouzinova,^{3,4} Alexander N. Vasiliev,¹ Boubacar Benziane,⁵ Andrey L. Zefirov,² Alexander V. Chibalin,⁵ Judith A. Heiny,⁶ and Igor I. Krivoi¹

¹Department of General Physiology, St. Petersburg State University, St. Petersburg 199034, Russia

²Department of Normal Physiology, Kazan State Medical University, Kazan 420012, Russia

³Department of Biomedicine, Aarhus University, 8000 Aarhus C, Denmark

⁴Translational Neuropsychiatry Unit, Department of Clinical Medicine, Aarhus University, 8240 Risskov, Denmark

⁵Integrative Physiology, Department of Molecular Medicine and Surgery, Karolinska Institutet, SE-171 77 Stockholm, Sweden

⁶Department of Molecular and Cellular Physiology, University of Cincinnati College of Medicine, Cincinnati, OH 45267

The Na,K-ATPase is essential for the contractile function of skeletal muscle, which expresses the $\alpha 1$ and $\alpha 2$ subunit isoforms of Na,K-ATPase. The $\alpha 2$ isozyme is predominant in adult skeletal muscles and makes a greater contribution in working compared with noncontracting muscles. Hindlimb suspension (HS) is a widely used model of muscle disuse that leads to progressive atrophy of postural skeletal muscles. This study examines the consequences of acute (6–12 h) HS on the functioning of the Na,K-ATPase $\alpha 1$ and $\alpha 2$ isozymes in rat soleus (disused) and diaphragm (contracting) muscles. Acute disuse dynamically and isoform-specifically regulates the electrogenic activity, protein, and mRNA content of Na,K-ATPase $\alpha 2$ isozyme in rat soleus muscle. Earlier disuse-induced remodeling events also include phospholemman phosphorylation as well as its increased abundance and association with $\alpha 2$ Na,K-ATPase. The loss of $\alpha 2$ Na,K-ATPase activity results in reduced electrogenic pump transport and depolarized resting membrane potential. The decreased $\alpha 2$ Na,K-ATPase activity is caused by a decrease in enzyme activity rather than by altered protein and mRNA content, localization in the sarcolemma, or functional interaction with the nicotinic acetylcholine receptors. The loss of extrajunctional $\alpha 2$ Na,K-ATPase activity depends strongly on muscle use, and even the increased protein and mRNA content as well as enhanced $\alpha 2$ Na,K-ATPase abundance at this membrane region after 12 h of HS cannot counteract this sustained inhibition. In contrast, additional factors may regulate the subset of junctional $\alpha 2$ Na,K-ATPase pool that is able to recover during HS. Notably, acute, low-intensity muscle workload restores functioning of both $\alpha 2$ Na,K-ATPase pools. These results demonstrate that the $\alpha 2$ Na,K-ATPase in rat skeletal muscle is dynamically and acutely regulated by muscle use and provide the first evidence that the junctional and extrajunctional pools of the $\alpha 2$ Na,K-ATPase are regulated differently.

Аннотация

Na,K-АТФаза важна для сократительной функции скелетных мышц, которые экспрессирует $\alpha 1$ - и $\alpha 2$ -изоформы Na,K-АТФазы. Изофермент $\alpha 2$ преобладает в зрелых скелетных мышцах и вносит больший вклад в работающих по сравнению с несокращающимися мышцами. Вывешивание задних конечностей (НС) - широко используемая модель неиспользования мышц, что вызывает прогрессирующую атрофию постуральных мышц. В этом исследовании рассматриваются последствия острого (6–12 ч) НС на функционирование $\alpha 1$ - и $\alpha 2$ -изоферментов Na,K-АТФазы в камбаловидной (неиспользуемая) и диафрагмальной (постоянно сокращающаяся) мышцах крысы. В камбаловидной мышце НС динамически и изоформ-специфично регулирует электрогенную активность, уровень белка и мРНК $\alpha 2$ -изофермента Na,K-АТФазы. Вызванное НС ремоделирование включает также фосфорилирование фосфолеммана, а также повышение его содержания и ассоциации с $\alpha 2$ -Na,K-АТФазой. Потеря активности $\alpha 2$ -Na,K-АТФазы приводит к снижению электрогенного транспорта и деполяризации мембранного потенциала покоя. Снижение активности $\alpha 2$ -Na,K-АТФазы вызвано снижением ферментативной активности, а не изменениями содержания белка и мРНК, локализации в сарколемме или функционального взаимодействия с никотиновыми холинорецепторами. Потеря внесинаптической активности $\alpha 2$ -Na,K-АТФазы сильно зависит от двигательной активности мышц и даже повышенный уровень белка и мРНК, а также повышенное содержание $\alpha 2$ -Na, К-АТФазы в этой области мембраны после 12 ч НС не могут противодействовать этому устойчивому ингибированию. Напротив, дополнительные факторы могут регулировать активность синаптического пула $\alpha 2$ -Na,K-АТФазы, которая способна восстанавливаться во время НС. Примечательно, кратковременная низкоинтенсивная мышечная активность восстанавливает работу обоих пулов $\alpha 2$ -Na,K-АТФазы. Эти результаты демонстрируют, что $\alpha 2$ -Na,K-АТФаза в скелетных мышцах крысы динамически и остро регулируется мышечной активностью и впервые доказывают, что синаптический и внесинаптический пулы $\alpha 2$ -Na,K-АТФазы регулируются по-разному.

Early endplate remodeling and skeletal muscle signaling events following rat hindlimb suspension

Alexander V. Chibalin¹  | Boubacar Benziane¹ | Guzalija F. Zakyrjanova^{2,3} | Violetta V. Kravtsova² | Igor I. Krivoi²

¹ Department of Molecular Medicine and Surgery, Integrative Physiology, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden

² Department of General Physiology, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

³ Department of Normal Physiology, Kazan State Medical University, Kazan, Russia

Correspondence

Alexander V. Chibalin, Department of Molecular Medicine and Surgery, Integrative Physiology, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden.

Email: alexander.chibalin@ki.se

Igor I. Krivoi, Department of General Physiology, St. Petersburg State University, 7/9 University emb., St. Petersburg 199034, Russia.

Email: iikrivoi@gmail.com

Motor endplates naturally undergo continual morphological changes that are altered in response to changes in neuromuscular activity. This study examines the consequences of acute (6–12 hr) disuse following hindlimb suspension on rat soleus muscle endplate structural stability. We identify early changes in several key signaling events including markers of protein kinase activation, AMPK phosphorylation and autophagy markers which may play a role in endplate remodeling. Acute disuse does not change endplate fragmentation, however, it decreases both the individual fragments and the total endplate area. This decrease was accompanied by an increase in the mean fluorescence intensity from the nicotinic acetylcholine receptors which compensate the endplate area loss. Muscle disuse decreased phosphorylation of AMPK and its substrate ACC, and stimulated mTOR controlled protein synthesis pathway and stimulated autophagy. Our findings provide evidence that changes in endplate stability are accompanied by reduced AMPK phosphorylation and an increase in autophagy markers, and these changes are evident within hours of onset of skeletal muscle disuse.

Аннотация

Двигательные концевые пластинки претерпевают постоянные морфологические изменения в ответ на изменение нервно-мышечной активности. В этом исследовании рассматриваются последствия острого (6–12 ч) неиспользования (двигательной разгрузки) путем вывешивания задних конечностей крыс на структурную устойчивость концевых пластинок камбаловидных мышц. Мы выявили ранние изменения в нескольких ключевых сигнальных событиях, включая маркеры активации протеинкиназ, маркеры фосфорилирования АМРК и аутофагии, которые могут играть роль в ремоделировании концевых пластинок. Острое неиспользование не влияет на фрагментацию концевых пластинок, однако, уменьшает площадь, как отдельных фрагментов, так и общую область концевых пластинок. Это снижение сопровождается увеличением средней интенсивности флуоресценции от никотиновых холинорецепторов, что компенсируют потерю общей площади концевых пластинок. Неиспользование мышц снижает уровень фосфорилирования АМРК и его субстрата АСС, стимулирует путь синтеза белка, контролируемый mTOR, а также стимулирует аутофагию. Наши результаты свидетельствуют о том, что изменения стабильности концевых пластинок сопровождаются снижением фосфорилирования АМРК и увеличением маркеров аутофагии, и эти изменения становятся очевидными уже в течение нескольких часов после начала неиспользования скелетных мышц.

5) Membrane lipid rafts are disturbed in the response of rat skeletal muscle to short-term disuse

Alexey M. Petrov,¹ Violetta V. Kravtsova,² Vladimir V. Matchkov,³ Alexander N. Vasiliev,² Andrey L. Zefirov,¹ Alexander V. Chibalin,⁴ Judith A. Heiny,⁵ and Igor I. Krivoi²

¹Department of Normal Physiology, Kazan State Medical University, Kazan, Russia; ²Department of General Physiology, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia; ³Department of Biomedicine, Aarhus University, Aarhus, Denmark;

⁴Department of Molecular Medicine and Surgery, Integrative Physiology, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden; and

⁵Department of Molecular and Cellular Physiology, University of Cincinnati College of Medicine, Cincinnati, Ohio

Petrov AM, Kravtsova VV, Matchkov VV, Vasiliev AN, Zefirov AL, Chibalin AV, Heiny JA, Krivoi II. Membrane lipid rafts are disturbed in the response of rat skeletal muscle to short-term disuse. *Am J Physiol Cell Physiol* 312: C627–C637, 2017. First published March 8, 2017; doi:10.1152/ajpcell.00365.2016.—Marked loss of skeletal muscle mass occurs under various conditions of disuse, but the molecular and cellular mechanisms leading to atrophy are not completely understood. We investigate early molecular events that might play a role in skeletal muscle remodeling during mechanical unloading (disuse). The effects of acute (6–12 h) hindlimb suspension on the soleus muscles from adult rats were examined. The integrity of plasma membrane lipid rafts was tested utilizing cholera toxin B subunit or fluorescent sterols. In addition, resting intracellular Ca^{2+} level was analyzed. Acute disuse disturbed the plasma membrane lipid-ordered phase throughout the sarcolemma and was more pronounced in junctional membrane regions. Ouabain (1 μM), which specifically inhibits the Na-K-ATPase $\alpha 2$ isozyme in rodent skeletal muscles, produced similar lipid raft changes in control muscles but was ineffective in suspended muscles, which showed an initial loss of $\alpha 2$ Na-K-ATPase activity. Lipid rafts were able to recover with cholesterol supplementation, suggesting that disturbance results from cholesterol loss. Repetitive nerve stimulation also restores lipid rafts, specifically in the junctional sarcolemma region. Disuse locally lowered the resting intracellular Ca^{2+} concentration only near the neuromuscular junction of muscle fibers. Our results provide evidence to suggest that the ordering of lipid rafts strongly depends on motor nerve input and may involve interactions with the $\alpha 2$ Na-K-ATPase. Lipid raft disturbance, accompanied by intracellular Ca^{2+} dysregulation, is among the earliest remodeling events induced by skeletal muscle disuse.

Аннотация

Заметная потеря массы скелетных мышц возникает в различных условиях их неиспользования, но молекулярные и клеточные механизмы атрофии не вполне понятны. Мы исследовали ранние молекулярные события, которые могут играть роль в ремоделировании скелетных мышц во время механической разгрузки. Изучали влияние острого (6–12 ч) вывешивания задних конечностей на камбаловидные мышцы взрослых крыс. Целостность липидных рафтов плазматической мембраны тестировали с помощью субъединицы В холерного токсина или флуоресцентных стероидов. Кроме того, оценивали уровень внутриклеточного Ca^{2+} . Вывешивание нарушало липид-упорядоченную фазу плазматической мембраны по всей сарколемме и было более выражено в синаптической области. Уабаин (1 мкМ), специфически ингибирующий $\alpha 2$ -изофермент Na,K-АТФазы в скелетных мышцах грызунов, вызывал аналогичные изменения липидных рафтов в контрольных мышцах, но был неэффективен в вывешенных мышцах, что указывает на потерю активности $\alpha 2$ -Na,K-АТФазы. Добавление холестерина восстанавливало липидные рафты; это показывает, что их нарушение является результатом потери холестерина. Стимуляция нерва также восстанавливала липидные рафты, особенно в синаптической области. Вывешивание локально снижало концентрацию внутриклеточного Ca^{2+} вблизи нервно-мышечного контакта. Наши результаты предполагают, что упорядоченность липидных рафтов зависит от моторного нервного входа и взаимодействия с $\alpha 2$ -Na,K-АТФазой. Нарушение липидных рафтов, сопровождающееся нарушением регуляции внутриклеточного Ca^{2+} , является одним из самых ранних событий ремоделирования неиспользуемых скелетных мышц.



Review

AMP-Activated Protein Kinase as a Key Trigger for the Disuse-Induced Skeletal Muscle Remodeling

Natalia A. Vilchinskaya ¹, Igor I. Krivoi ² and Boris S. Shenkman ^{1,*}

¹ Myology Laboratory, Institute of Biomedical Problems RAS, Moscow 123007, Russia; vilchinskayanatalia@gmail.com

² Department of General Physiology, St. Petersburg State University, St. Petersburg 199034, Russia; iikrivoi@gmail.com

* Correspondence: bshenkman@mail.ru

Received: 1 October 2018; Accepted: 9 November 2018; Published: 12 November 2018



Abstract: Molecular mechanisms that trigger disuse-induced postural muscle atrophy as well as myosin phenotype transformations are poorly studied. This review will summarize the impact of 5' adenosine monophosphate -activated protein kinase (AMPK) activity on mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1)-signaling, nuclear-cytoplasmic traffic of class IIa histone deacetylases (HDAC), and myosin heavy chain gene expression in mammalian postural muscles (mainly, soleus muscle) under disuse conditions, i.e., withdrawal of weight-bearing from ankle extensors. Based on the current literature and the authors' own experimental data, the present review points out that AMPK plays a key role in the regulation of signaling pathways that determine metabolic, structural, and functional alternations in skeletal muscle fibers under disuse.

Аннотация

Молекулярные механизмы, которые запускают вызванную неиспользованием (функциональной разгрузкой) атрофию постуральных мышц, а также трансформацию миозинового фенотипа, изучены недостаточно. Этот обзор суммирует данные о влиянии активности 5' аденозин-монофосфат-активируемой протеинкиназы (АМРК) на мишень рапамицина у млекопитающих (комплекс mTORC1-сигналикации), ядерно-цитоплазматический трафик гистона класса IIa деацетилазы (HDAC) и экспрессию генов тяжелых цепей миозина в постуральных мышцах млекопитающих (в основном в камбаловидной мышце) в условиях их неиспользования, т. е. при снятии нагрузки с голеностопного сустава разгибателей. Настоящий обзор основан на современной литературе и собственных экспериментальных данных авторов и подчеркивает, что АМРК играет ключевую роль в регуляции сигнальных путей, которые определяют метаболические, структурные и функциональные изменения в волокнах скелетных мышц при их неиспользовании.



Review

Cholesterol and the Safety Factor for Neuromuscular Transmission

Igor I. Krivoi ¹ and Alexey M. Petrov ^{2,3,*}

¹ Department of General Physiology, St. Petersburg State University, St. Petersburg 199034, Russia; iikrivoi@gmail.com

² Institute of Neuroscience, Kazan State Medical University, Butlerova st. 49, Kazan 420012, Russia

³ Laboratory of Biophysics of Synaptic Processes, Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, Federal Research Center “Kazan Scientific Center of RAS”, P. O. Box 30, Lobachevsky Str., 2/31, Kazan 420111, Russia

* Correspondence: fysio@rambler.ru

Received: 30 January 2019; Accepted: 24 February 2019; Published: 28 February 2019



Abstract: A present review is devoted to the analysis of literature data and results of own research. Skeletal muscle neuromuscular junction is specialized to trigger the striated muscle fiber contraction in response to motor neuron activity. The safety factor at the neuromuscular junction strongly depends on a variety of pre- and postsynaptic factors. The review focuses on the crucial role of membrane cholesterol to maintain a high efficiency of neuromuscular transmission. Cholesterol metabolism in the neuromuscular junction, its role in the synaptic vesicle cycle and neurotransmitter release, endplate electrogenesis, as well as contribution of cholesterol to the synaptogenesis, synaptic integrity, and motor disorders are discussed.

Аннотация

Настоящий обзор посвящен анализу литературных данных и результатов собственных исследований. Нервно-мышечное соединение скелетных мышц отвечает за запуск сокращения поперечно-полосатых мышечных волокон в ответ на активность двигательных нейронов. Гарантийный фактор нервно-мышечной передачи сильно зависит от множества пре- и постсинаптических факторов. Обзор посвящен решающей роли мембранного холестерина в поддержании высокой эффективности нервно-мышечной передачи. Обсуждаются метаболизм холестерина в нервно-мышечном соединении, его роль в цикле синаптических везикул и высвобождении нейротрансмиттеров, поддержании электрогенеза концевой пластинки, а также вклад холестерина в синаптогенез, синаптическую целостность и двигательные нарушения.

Claudin expression in follicle-associated epithelium of rat Peyer's patches defines a major restriction of the paracellular pathway

A. G. Markov,^{1,*} E. L. Falchuk,^{1,*} N. M. Kruglova,¹ J. Radloff² and S. Amasheh^{2,3}

¹ Institute of General Physiology, Biological Faculty, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

² Institute of Veterinary Physiology, Freie Universität Berlin, Berlin, Germany

³ Institute of Clinical Physiology, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany

Received 15 April 2015,
revision requested 19 May 2015,
revision received 22 June 2015,
accepted 24 July 2015
Correspondence: S. Amasheh,
Institute of Veterinary Physiology,
Charitéweg 11b, 14163 Berlin,
Germany.
E-mail: saah.amasheh@fu-berlin.de

*These authors contributed
equally to this work.

See Editorial Commentary:
Diener, M. Roadblock for antigens
– take a detour via M cells. *Acta
Physiol* 215, 13–14.

Abstract

Aim: Members of the tight junction protein family of claudins have been demonstrated to specifically determine paracellular permeability of the intestinal epithelium. In small intestinal mucosa, which is generally considered to be a leaky epithelium, Peyer's patches are a primary part of the immune system. The aim of this study was to analyse the tight junctional barrier of follicle-associated epithelium covering Peyer's patches (lymphoid follicles).

Methods: Employing small intestinal tissue specimens of male Wistar rats, electrophysiological analyses including the Ussing chamber technique, marker flux measurements and one-path impedance spectroscopy were performed. Morphometry of HE-stained tissue sections was taken into account. Claudin expression and localization was analysed by immunoblotting and confocal laser scanning immunofluorescence microscopy.

Results: Almost twofold higher parameters of epithelial and transepithelial tissue resistance and a markedly lower permeability for the paracellular permeability markers 4 and 20 kDa FITC-dextran were detected in follicle-associated epithelium compared to neighbouring villous epithelium. Analysis of claudin expression and localization revealed a stronger expression of major sealing proteins in follicle-associated epithelium, including claudin-1, claudin-4, claudin-5 and claudin-8. Therefore, the specific expression and localization of claudins is in accordance with barrier properties of follicle-associated epithelium vs. neighbouring villous epithelium.

Conclusion: We demonstrate that follicle-associated epithelium is specialized to ensure maximum restriction of the epithelial paracellular pathway in Peyer's patches by selective sealing of tight junctions. This results in an exclusive transcellular pathway of epithelial cells as the limiting and mandatory route for a controlled presentation of antigens to the underlying lymphocytes under physiological conditions.

Keywords: impedance spectroscopy, tight junctions, tissue barrier, villous epithelium.

Аннотация

Члены семейства белков плотных контактов клаудины специфически определяют параклеточную проницаемость кишечного эпителия. В слизистой оболочке тонкой кишки, которая обычно считается проницаемым эпителием, Пейеровы бляшки являются основной частью иммунной системы. Целью этого исследования было проанализировать плотные Пейеровы бляшки пятна (лимфоидные фолликулы). Электрофизиологические параметры образцов ткани тонкого кишечника самцов крыс Wistar были исследованы в камеры Уссинга, а также измерения потока маркеров и односторонняя импедансная спектроскопия. Учитывалась морфометрия срезов тканей, окрашенных гематоксилоном. Экспрессию и локализацию клаудина анализировали с помощью иммуноблоттинга и конфокальной лазерной сканирующей иммунофлуоресцентной микроскопии. В фолликул-ассоциированном эпителии были обнаружены почти в два раза более высокие параметры устойчивости эпителиальной и трансэпителиальной ткани и заметно более низкая проницаемость для маркеров параклеточной проницаемости 4 и 20 кДа FITC-декстран по сравнению с соседним ворсинчатым эпителием. Анализ экспрессии и локализации клаудина выявил более сильную экспрессию основных герметизирующих белков в фолликул-ассоциированном эпителии, включая клаудин-1, клаудин-4, клаудин-5 и клаудин-8. Следовательно, специфическая экспрессия и локализация клаудинов соответствуют барьерным свойствам фолликул-ассоциированного эпителия по сравнению с соседним ворсинчатым эпителием. Связанный с фолликулом эпителий специализируется на обеспечении максимального ограничения эпителиального парацеллюлярного пути в Пейеровых бляшках путем избирательного уплотнения плотных контактов. Это приводит к исключительному трансцеллюлярному пути эпителиальных клеток в качестве ограничивающего и обязательного пути для контролируемой презентации антигенов нижележащим лимфоцитам в физиологических условиях.

Critical Review



The Epithelial Barrier and Beyond: Claudins as Amplifiers of Physiological Organ Functions

Alexander G. Markov¹
Jörg R. Aschenbach²
Salah Amasheh^{2*}

¹Department of General Physiology, St. Petersburg State University, Russia

²Department of Veterinary Medicine, Freie Universität Berlin, Institute of Veterinary Physiology, Berlin, Germany

Abstract

Epithelial cell layers are interconnected by a meshwork of tight junction (TJ) protein strands, which are localized within apicolateral membranes. The proteins that form TJs are regarded to provide a static barrier, determining epithelial properties. However, recent findings in the field of barriology suggest that TJs contribute to more physiological aspects than indicated by the sum of the qualities of the single TJ proteins. Generally, TJs exhibit four major functions: (i) a "gate function," defining trans-epithelial permeability (i.e., barrier) properties, (ii) a "fence function" determining epithelial cell polarity, (iii) a "signaling function," affecting regulatory pathways, and (iv) a "stabilizing function," maintaining the integrity of the epithelium. This

review presents a critical view on how the efficacy of physiological processes in epithelia and thus organ function might be improved by changes in the expression of claudins, the latter representing the largest and most variable family of TJ proteins. Major focus is set on (i) the coordinated regulation of transport and barrier in the intestine, (ii) the role of TJs in defining the route for antigen uptake and presentation in intestinal Peyer's patches, and (iii) the TJ function in mammary glands in response to milk accumulation, which represent impressive examples to highlight the amplification of epithelial functions by TJ proteins. © 2017 IUBMB Life, 69(5):290–296, 2017

Аннотация

Слои эпителиальных клеток связаны между собой сеткой плотных белковых нитей (ТЖ), которые локализуются в апиколатеральной мембране. Считается, что белки, образующие ТЖ, обеспечивают статический барьер, определяющий эпителиальные свойства. Однако недавние открытия в области барьерологии предполагают, что ТЖ вносят вклад в большее количество физиологических аспектов, чем указано суммой качеств отдельных белков ТЖ. Как правило, ТЖ обладают четырьмя основными функциями: (i) «воротная функция», определяющая свойства трансэпителиальной проницаемости (т.е. барьерные), (ii) «ограждающая функция», определяющая полярность эпителиальных клеток, (iii) «сигнальная функция», влияющая на регуляторные пути и (iv) «стабилизирующая функция», поддерживающая целостность эпителия. Этот обзор представляет критический взгляд на то, как эффективность физиологических процессов в эпителии и, таким образом, функции органов могут быть улучшены за счет изменений в экспрессии клаудинов, последний представляет собой самое большое и наиболее вариабельное семейство белков ТЖ. Основное внимание уделяется (i) координированной регуляции транспорта и барьера в кишечнике, (ii) роли ТЖ в определении пути поглощения и презентации антигена в Пейеровых бляшках кишечника и (iii) функции ТЖ в молочных железах. в ответ на накопление молока, что представляет собой впечатляющий пример усиления эпителиальных функций белками ТЖ.

Article

Caprate modulates intestinal barrier function in porcine Peyer's patch follicle-associated epithelium

Judith Radloff^{1,2}, Valeria Cornelius¹, Alexander G Markov³, Salah Amasheh^{1,*}

¹ Institute of Veterinary Physiology, Department of Veterinary Medicine, Freie Universität Berlin;

² Department for Biomedical Sciences, University of Veterinary Medicine, Vienna, Austria;

³ Department of General Physiology, St. Petersburg State University, Universitetskaya nab. 7/9, 199034 St. Petersburg, Russia; markov_51@mail.ru

* Correspondence: salah.amasheh@fu-berlin.de; Tel.: +49-30-838-62602

Received: date; Accepted: date; Published: date

Abstract: (1) Background: Many food components influence intestinal epithelial barrier properties and might therefore also affect susceptibility to the development of food allergies. Such allergies are triggered by increased antibody production initiated in Peyer's patches (PP). Usually, the presentation of antigens in the lumen of the gut to the immune cells of the PP is strongly regulated by the follicle-associated epithelium (FAE) that covers the PP. As the food component caprate has been shown to impede barrier properties in villous epithelium, we hypothesized that caprate also affects the barrier function of the PP FAE, thereby possibly contributing a risk factor for the development of food allergies. (2) Methods: In this study, we have focused on the effects of caprate on the barrier function of PP, employing in vitro and ex vivo experimental setups to investigate functional and molecular barrier properties. (3) Incubation with caprate induced an increase of transepithelial resistance, and a marked increase of permeability for the paracellular marker fluorescein in porcine PP to 180% of control values. These effects are in accordance with changes in the expression levels of the barrier-forming tight junction proteins tricellulin and claudin-5. (4) Conclusions: This barrier-affecting mechanism could be involved in the initial steps of a food allergy, since it might trigger unregulated contact of the gut lumen with antigens.

Аннотация

Многие пищевые компоненты влияют на свойства кишечного эпителиального барьера и, следовательно, могут также влиять на восприимчивость к развитию пищевой аллергии. Такая аллергия вызывается повышенным продуцированием антител, инициированным в Пейеровых бляшках (РР). Обычно презентация антигенов в просвете кишечника иммунным клеткам РР строго регулируется фолликул-ассоциированным эпителием (FAE), который покрывает РР. Поскольку было показано, что капрат препятствует барьерным свойствам ворсинчатого эпителия, мы предположили, что капрат также влияет на барьерную функцию РР FAE, тем самым, возможно, внося свой вклад в факторы риска развития пищевой аллергии. В этом исследовании мы сосредоточили внимание на влиянии капрата на барьерную функцию, используя экспериментальные установки *in vitro* и *ex vivo* для исследования функциональных и молекулярных барьерных свойств. Инкубация с капратом вызвала увеличение трансэпителиального сопротивления и заметное увеличение проницаемости для параклеточного маркера флуоресцеина в РР свиньи до 180% от контрольных значений. Эти эффекты согласуются с изменениями уровней экспрессии белков плотных контактов, образующих барьер, трицеллюлина и клаудина-5. Этот механизм воздействия на барьер может быть задействован на начальных этапах пищевой аллергии, поскольку он может вызвать нерегулируемый контакт просвета кишечника с антигенами.



Molecular Characterization of Barrier Properties in Follicle-Associated Epithelium of Porcine Peyer's Patches Reveals Major Sealing Function of Claudin-4

Judith Radloff¹, Evgeny L. Falchuk², Alexander G. Markov² and Salah Amasheh^{1*}

¹ Institute of Veterinary Physiology, Freie Universität Berlin, Berlin, Germany; ² Department of General Physiology, Saint Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

OPEN ACCESS

Edited by:

Pushpendra Singh,
Johns Hopkins School of Medicine,
United States

Reviewed by:

Kausar Bagam Raz Ahmed,
United States Food and Drug
Administration, United States
Anuj Kumar Sharma,
Princeton University, United States
Amol Ranjan,
Stowers Institute for Medical
Research, United States

*Correspondence:

Salah Amasheh
salah.amasheh@fu-berlin.de

Specialty section:

This article was submitted to
Membrane Physiology and Membrane
Biophysics,
a section of the journal
Frontiers in Physiology

Received: 18 April 2017

Accepted: 26 July 2017

Published: 14 August 2017

The pig represents a preferred model for the analysis of intestinal immunology. However, the barrier of the follicle-associated epithelium (FAE) covering porcine Peyer's patches (PP) has not yet been characterized in detail. This study aimed to perform this characterization in order to pave the way toward an understanding of the functional contribution of epithelial barrier properties in gut immunology. Porcine tissue specimens were taken from the distal small intestine in order to obtain electrophysiological data of PP FAE and neighboring villous epithelium (VE), employing the Ussing chamber technique. Transepithelial resistance (TER) and paracellular fluorescein flux were measured, and tissues were morphometrically compared. In selfsame tissues, expression and localization of major tight junction (TJ) proteins (claudin-1, -2, -3, -4, -5, and -8) were analyzed. PP FAE specimens showed a higher TER and a lower apparent permeability for sodium fluorescein than VE. Immunoblotting revealed an expression of all claudins within both epithelia, with markedly stronger expression of the sealing TJ protein claudin-4 in PP FAE compared with the neighboring VE. Immunohistochemistry confirmed the expression and localization of all claudins in both PP FAE and VE, with stronger claudin-4 abundance in PP FAE. The results are in accordance with the physiological function of the FAE, which strongly regulates and limits antigen uptake determining a mandatory transcellular route for antigen presentation, highlighting the importance of this structure for the first steps of the intestinal immune response. Thus, this study provides detailed insights into the specific barrier properties of the porcine FAE covering intestinal PP, at the interface of intestinal immunology and barrierology.

Keywords: claudins, tissue barrier, tight junction, pig intestine, gut-associated lymphoid tissue

Аннотация

Свинья представляет собой предпочтительную модель для анализа кишечной иммунологии. Однако барьер фолликул-ассоциированного эпителия (FAE), покрывающего Пейеровы бляшки (PP) свиньи, еще не был подробно охарактеризован. Это исследование было направлено на выполнение этой характеристики, чтобы проложить путь к пониманию функционального вклада свойств эпителиального барьера в иммунологию кишечника. Образцы ткани свиньи были взяты из дистального отдела тонкой кишки, чтобы получить электрофизиологические данные PP FAE и соседнего ворсинчатого эпителия (VE), используя метод камеры Уссинга. Измеряли трансэпителиальное сопротивление (TER) и параклеточный поток флуоресцеина, а также морфометрически сравнивали ткани. В одних и тех же тканях экспрессия и локализация белков плотных контактов (TJ) (клаудин-1, -2, -3, -4, -5 и -8) были проанализированы. Образцы PP FAE показали более высокий TER и более низкую проницаемость для флуоресцеина натрия, чем VE. Иммуноблоттинг выявил экспрессию всех клаудинов внутри обоих эпителиев с заметно более сильной экспрессией уплотняющего белка клаудина-4 в PP FAE по сравнению с соседним VE. Иммуногистохимия подтвердила экспрессию и локализацию всех клаудинов как в PP FAE, так и в VE, с более сильным содержанием клаудина-4 в PP FAE. Результаты соответствуют физиологической функции FAE, которая строго регулирует и ограничивает захват антигена, определяя обязательный транс клеточный путь презентации антигена, подчеркивая важность этой структуры для первых шагов кишечного иммунного ответа. Таким образом, это исследование обеспечивает детальное понимание специфических барьерных свойств FAE свиньи, покрывающего Пейеровы бляшки кишечника, на стыке кишечной иммунологии и барриологии.

Porcine milk induces a strengthening of barrier function in porcine jejunal epithelium *in vitro*

Judith Radloff,¹ Silke S. Zakrzewski,¹ Robert Pieper,² Alexander G. Markov,³ and Salah Amasheh¹

¹Institute of Veterinary Physiology, Freie Universität Berlin, Berlin, Germany. ²Institute of Animal Nutrition, Freie Universität Berlin, Berlin, Germany. ³Department of General Physiology, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

Address for correspondence: Salah Amasheh, Institute of Veterinary Physiology, Freie Universität Berlin, Oertzenweg 19b, 14163 Berlin, Germany. salah.amasheh@fu-berlin.de

Milk contains a variety of components that have been shown to affect the expression and localization of epithelial tight junction proteins and therefore the intestinal barrier. Thus, we hypothesized that milk would have an effect on intestinal barrier properties, owing to effects on the tight junction in an intraspecies porcine intestinal *in vitro* model. Jejunal samples of piglets derived from different age groups were analyzed. Transepithelial electrical resistance was recorded employing the Ussing chamber technique. Porcine milk or predigested milk in buffer solution was added to the apical side, and effects were compared to untreated controls. Unidirectional paracellular flux measurements were performed using sodium fluorescein. Tight junction protein expression and localization were analyzed by immunoblotting and immunofluorescence microscopy. Incubation with milk or predigested milk led to an increase in transepithelial electrical resistance, while paracellular permeability for sodium fluorescein did not result in significant changes. Densitometric analysis of immunoblot signals did not show significant alterations in claudin expression, but a reduction of claudin signals in apicolateral membrane compartments in both approaches became apparent via immunohistology. The functional effect might reflect a physiological protective mechanism, when offspring exclusively rely on their mother's milk and are exposed to a plethora of potentially barrier-perturbing factors.

Аннотация

Молоко содержит множество компонентов, которые, как было показано, влияют на экспрессию и локализацию белков плотных контактов эпителия и, следовательно, на кишечный барьер. Таким образом, мы предположили, что молоко может влиять на свойства кишечного барьера из-за воздействия на плотные контакты в модели кишечника свиней *in vitro*. Были проанализированы образцы тощей кишки поросят разных возрастных групп. Трансэпителиальное электрическое сопротивление регистрировали с использованием техники камеры Уссинга. Свиное молоко или предварительно пастеризованное молоко в буферном растворе добавляли к апикальной стороне, и эффекты сравнивали с необработанными контролями. Однонаправленные измерения параклеточного потока выполнялись с использованием флуоресцеина натрия. Экспрессию и локализацию белка плотного соединения анализировали с помощью иммуноблоттинга и иммунофлуоресцентной микроскопии. Инкубация с молоком или пастеризованным молоком приводила к увеличению трансэпителиального электрического сопротивления, в то время как параклеточная проницаемость для флуоресцеина натрия не приводила к значительным изменениям. Денситометрический анализ сигналов иммуноблоттинга не показал значительных изменений в экспрессии клаудина, но снижение сигналов клаудина в апиколатеральных мембранных компартментах в обоих подходах стало очевидным. очевидно с помощью иммуногистологии. Функциональный эффект может отражать физиологический защитный механизм, когда потомство полагается исключительно на материнское молоко и подвергается воздействию множества факторов, потенциально нарушающих барьер.

Is Homoarginine a Protective Cardiovascular Risk Factor?

Ekaterina S. Karetnikova, Natalia Jarzebska, Alexander G. Markov, Norbert Weiss,
Steven R. Lentz, Roman N. Rodionov

Abstract—A series of recent epidemiological studies have implicated the endogenous nonproteinogenic amino acid L-homoarginine as a novel candidate cardiovascular risk factor. The association between homoarginine levels and the risk of adverse cardiovascular outcomes is inverse (ie, high cardiovascular risk is predicted by low rather than high homoarginine levels), which makes it plausible to normalize systemic homoarginine levels via oral supplementation. The emergence of homoarginine as a potentially treatable protective cardiovascular risk factor has generated a wave of hope in the field of cardiovascular prevention. Herein, we review the biochemistry, physiology, and metabolism of homoarginine, summarize the strengths and weaknesses of the epidemiological evidence linking homoarginine to cardiovascular disease and its potential protective cardiovascular effects, and identify priorities for future research needed to define the clinical utility of homoarginine as a prognostic factor and therapeutic target in cardiovascular disease. (*Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2019;39:00-00. DOI: 10.1161/ATVBAHA.118.312218.)

Key Words: cardiovascular disease ■ epidemiological studies ■ homoarginine ■ risk factor
■ single nucleotide polymorphism

Despite significant progress over the last 3 decades, cardiovascular disease (CVD) continues to be the leading cause of morbidity and mortality worldwide.¹ Implementation of guideline-based risk stratification and management based on established CVD risk factors such as hypertension, cholesterol, diabetes mellitus, and smoking led to declining cardiovascular mortality trends from 1980 to 2015.² However, more recent data indicate that the age-adjusted death rate from heart disease is no longer continuing to decline, which suggests a need for the identification of novel risk factors and prevention strategies.³ Discovery of novel risk factors may enable early recognition of a subset of currently unidentified patients at high risk, allowing for subsequent initiation of early and more aggressive interventions.

Recently, a series of intriguing epidemiological papers have implicated the endogenous non-proteinogenic amino acid L-homoarginine (hArg) as a novel candidate cardiovascular risk factor. Unlike many other risk factors, increased cardiovascular risk is associated not with elevated blood levels but rather with low levels of hArg, indicating that hArg may be protective and suggesting the possibility that risk might be mitigated through hArg supplementation.

still not entirely clear and it remains to be determined how much endogenous hArg is derived from food intake versus enzymatic production. The mitochondrial enzyme AGAT (arginine:glycine amidinotransferase) catalyzes the synthesis of hArg from arginine and lysine (Figure 1).⁴⁻⁶ Two large genome-wide association studies have demonstrated that single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the AGAT gene correlate with plasma hArg concentration.^{8,10} An alternative source of hArg by enzymes of the urea cycle has been suggested,¹⁰⁻¹² but the importance or even the very existence of this pathway of hArg production in vivo has been questioned and requires further investigation.^{6,9}

Catabolism and Excretion

Early in vitro studies suggested that hArg might serve as an alternative substrate for NOS (nitric oxide synthases and either a weak substrate or inhibitor of arginases.¹³⁻¹⁶ We recently demonstrated that metabolism of hArg by NOS and arginase also takes place in vivo in mice.¹⁷ Interestingly, the genome-wide association studies performed by Kleber et al¹⁰ identified a suggestive association of serum hArg concentration with an SNP in an intron within the mediator complex subunit 23/arginase 1 (*MED23/ARG1*) locus. However, no associations were detected between serum hArg and several pathogenic SNPs in the *ARG1* gene that are known to cause arginase deficiency. Similarly, no associations with NOS genes were observed, so the relative contribution of NOS and arginase-mediated pathways to hArg catabolism in humans is still undefined.¹⁰ We

Homoarginine Metabolism

Dietary Consumption and Synthesis

hArg is present in some foods and is readily absorbed in the gastrointestinal tract⁴ but the main dietary sources of hArg are

Received on: November 23, 2018; final version accepted on: February 26, 2019.
From the Department of Physiology, Saint-Petersburg State University, Russia (E.S.K., A.G.M.); Division of Angiology, Department of Internal Medicine III, University Center for Vascular Medicine, University Hospital "Carl Gustav Carus", Technische Universität Dresden, Germany (N.J., N.W., R.N.R.); Department of Internal Medicine, University of Iowa Carver College of Medicine (S.R.L.); and Flinders University, Adelaide, Australia (R.N.R.).
Correspondence to: Roman N. Rodionov, MD, PhD, University Center for Vascular Medicine, University Hospital "Carl Gustav Carus", Technische Universität Dresden, Fetscherstraße 74, 01307 Dresden, Germany. Email: Roman.Rodionov@uniklinikum-dresden.de
© 2019 American Heart Association, Inc.

Аннотация

Ряд недавних эпидемиологических исследований выявил участие эндогенной непротеиногенной аминокислоты гомоаргинина как нового кандидата в фактор риска сердечно-сосудистых заболеваний. Связь между уровнями гомоаргинина и риском неблагоприятных сердечно-сосудистых исходов являются обратными (т. е. высокий сердечно-сосудистый риск прогнозируется низким, а не высоким уровнем гомоаргинина), что делает возможным нормализовать системные уровни гомоаргинина с помощью пероральных добавок. Появление гомоаргинина как потенциального защитного фактора риска сердечно-сосудистых заболеваний породил волну надежд в области сердечно-сосудистой профилактики. В обзоре рассматривается биохимия, физиология и метаболизм гомоаргинина, резюмируются сильные и слабые стороны эпидемиологических данных, связывающих гомоаргинин с сердечно-сосудистыми заболеваниями и их потенциальные защитные сердечно-сосудистые эффекты, а также определение приоритетов будущих исследований, необходимых для определения клинической применимости гомоаргинина как прогностического фактора и терапевтической мишени при сердечно-сосудистых заболеваниях.



Increased paracellular permeability of tumor-adjacent areas in 1,2-dimethylhydrazine-induced colon carcinogenesis in rats

Viktoria V. Bekusova¹, Evgeny L. Falchuk¹, Larisa S. Okorokova¹, Natalia M. Kruglova¹, Alexander D. Nozdachev^{1,2}, Alexander G. Markov¹

¹Department of Physiology, St. Petersburg State University, St. Petersburg 197183, Russia; ²I.P. Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg 199034, Russia

ABSTRACT

Objective: The morphology and functions of the proximal and distal large intestine are not the same. The incidence of colorectal cancer in these regions is also different, as tumors more often appear in the descending colon than in the ascending colon. Inflammatory bowel disease and colorectal cancer can increase transepithelial permeability, which is a sign of reduced intestinal barrier function. However, there is not enough evidence to establish a connection between the difference in colorectal cancer incidence in the proximal and distal colon and intestinal permeability or the effects of carcinogenesis on the barrier properties in various areas of the colon. The aim of the study was to assess the permeability of different segments of the large intestine according to a developed mapping methodology in healthy rats and rats with 1,2-dimethylhydrazine (DMH)-induced colon adenocarcinoma.

Methods: The short circuit current, the transepithelial electrical resistance and the paracellular permeability to fluorescein of large intestine wall of male Wistar rats were examined in the Ussing chambers. The optical density of the solution from the serosa side to assess the concentration of the diffused fluorescein from mucosa to serosa was analyzed by spectrophotometry. The morphometric and histological studies were performed by optical microscopy.

Results: Rats with DMH-induced colon adenocarcinomas showed elevated transepithelial electrical resistance in the areas of neoplasm development. In contrast, there was no change in the electrophysiological properties of tumor adjacent areas, however, the paracellular permeability of these areas to fluorescein was increased compared to the control rats and was characterized by sharply reduced barrier function.

Conclusions: The barrier properties of the colon vary depending on tumor location. The tumors were less permeable than the intact intestinal wall and probably have a negative influence on tumor-adjacent tissues by disrupting their barrier function.

Аннотация

Морфология и функции проксимального и дистального отделов толстой кишки не совпадают. Заболеваемость колоректальным раком в этих регионах также отличается, поскольку опухоли чаще появляются в нисходящей ободочной кишке, чем в восходящей. Воспалительное заболевание кишечника и колоректальный рак могут увеличить трансэпителиальную проницаемость, что является признаком снижения кишечной проницаемости. Однако недостаточно доказательств, чтобы установить связь между различиями в колоректальном раке в проксимальном и дистальном отделе толстой кишки и кишечной проницаемостью или влияние канцерогенеза на барьерные свойства в различных областях толстой кишки. Целью исследования было оценить проницаемость различных сегментов толстой кишки в зависимости от разработанной методологии картирования здоровых крыс и крыс с 1,2-диметилгидразином (ДМН)-индуцированной аденокарциномой толстой кишки. Измеряли ток короткого замыкания, трансэпителиальное электрическое сопротивление и параклеточная проницаемость для флуоресцеина большого размера. Стенку кишечника самцов крыс линии Вистар исследовали в камерах Уссинга. Оптическая плотность раствора со стороны серозной оболочки для оценки концентрации диффузного флуоресцеина от слизистой до серозной анализировали спектрофотометрией. Морфометрические и гистологические исследования выполнены с помощью оптической микроскопии. Крысы с аденокарциномами толстой кишки, вызванными ДМН, показали повышенное трансэпителиальное электрическое сопротивление в областях развития новообразования. Напротив, не было изменений электрофизиологических свойств прилегающих к опухоли областей, однако, параклеточная проницаемость этих областей для флуоресцеина была увеличена по сравнению с контрольными крысами и характеризовалась резко сниженной барьерной функцией. Барьерные свойства толстой кишки варьируются в зависимости от локализации опухоли. Опухоли были менее проницаемы, чем неповрежденная стенка кишечника и, вероятно, оказывает негативное влияние на ткани, прилегающие к опухоли, нарушая их барьерную функцию.



Hydrostatic pressure incubation affects barrier properties of mammary epithelial cell monolayers, *in vitro*

Katharina S. Mießler^a, Alexander G. Markov^b, Salah Amasheh^{a,*}

^a Institute of Veterinary Physiology, Freie Universität Berlin, Oertzenweg 19b, 14163 Berlin, Germany

^b Department of General Physiology, St. Petersburg State University, Universitetskaya nab. 7/9, 199034 St. Petersburg, Russia

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 November 2017

Accepted 17 November 2017

Available online xxx

Keywords:

Barrier function

Tight junction

Ussing chamber

Hydrostatic pressure

Mammary gland

HC11

ABSTRACT

During lactation, accumulation of milk in mammary glands (MG) causes hydrostatic pressure (HP) and concentration of bioactive compounds. Previously, a changed expression of tight junction (TJ) proteins was observed in mice MGs by accumulation of milk, *in vivo*. The TJ primarily determines the integrity of the MG epithelium. The present study questioned whether HP alone can affect the TJ in a mammary epithelial cell model, *in vitro*. Therefore, monolayers of HC11, a mammary epithelial cell line, were mounted into modified Ussing chambers and incubated with 10 kPa bilateral HP for 4 h. Short circuit current and transepithelial resistance were recorded and compared to controls, and TJ proteins were analyzed by Western blotting and immunofluorescent staining. In our first approach HC11 cells could withstand the pressure incubation and a downregulation of occludin was observed. In a second approach, using prolactin- and dexamethasone-induced cells, a decrease of short circuit current was observed, beginning after 2 h of incubation. With the addition of 1 mM barium chloride to the bathing solution the decrease could be blocked temporarily. On molecular level an upregulation of ZO-1 could be observed in hormone-induced cells, which was downregulated after the incubation with barium chloride. In conclusion, bilateral HP incubation affects mammary epithelial monolayers, *in vitro*. Both, the reduction of short circuit current and the change in TJ proteins may be interpreted as physiological requirements for lactation.

© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

Аннотация

Во время лактации накопление молока в молочных железах (MG) вызывает гидростатическое давление (HP) и увеличение концентрации биологически активных соединений. Ранее измененная экспрессия белков плотных контактов (TJ) наблюдалась у MGs мышей по накоплению молока *in vivo*. TJ в первую очередь определяет целостность эпителий MG. В настоящем исследовании ставится под вопрос, может ли только HP влиять на TJ в молочной железе в модели эпителиальных клеток *in vitro*. Многослой HC11, линии эпителиальных клеток молочной железы, были устанавливали в модифицированные камеры Уссинга и инкубировали с двусторонним HP 10 кПа в течение 4 часов. Ток короткого замыкания, трансэпителиальная резистентность регистрировались и сравнивались с контролем, а белки TJ были анализировали вестерн-блоттингом и иммунофлуоресцентным окрашиванием. В нашем первом подходе клетки HC11 могли выдерживать инкубацию под давлением, и наблюдалось снижение уровня окклюдина. Подход, использующий клетки, индуцированные пролактином и дексаметазоном, позволил снизить ток короткого замыкания, начиная с 2 ч инкубации. При добавлении в ванну 1 mM хлорида бария снижение может быть временно заблокировано. На молекулярном уровне активация ZO-1 может быть наблюдается в индуцированных гормонами клетках, уровень которых снижается после инкубации с хлоридом бария. В заключение, двусторонняя инкубация HP влияет на многослой эпителия молочной железы *in vitro*. Оба, уменьшение тока короткого замыкания и изменение белков TJ можно интерпретировать как физиологические потребности для кормления грудью.



Cholera toxin perturbs the paracellular barrier in the small intestinal epithelium of rats by affecting claudin-2 and tricellulin

Alexander G. Markov¹ · Olga N. Vishnevskaya¹ · Larisa S. Okorokova¹ · Arina A. Fedorova¹ · Natalia M. Kruglova¹ · Oksana V. Rybalchenko² · Jörg R. Aschenbach³ · Salah Amasheh³

Received: 20 December 2018 / Revised: 12 June 2019 / Accepted: 13 June 2019
 © Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2019

Abstract

Cholera toxin is commonly known to induce chloride secretion of the intestine. In recent years, effects on epithelial barrier function have been reported, indicating synergistic co-regulation of transporters and tight junction proteins. Our current study focused on the analysis of cholera toxin effects on transepithelial resistance and on tight junction proteins, the latter known as structural correlates of barrier function. Ligated segments of the rat jejunum were injected with buffered solution containing cholera toxin (1 µg/ml) and incubated for 4 h. Subsequently, selfsame tissue specimens were mounted in Ussing chambers, and cholera toxin (1 µg/ml) was added on the apical side. Transepithelial resistance and permeability of sodium fluorescein (376 Da) were analyzed. Subsequently, tissues were removed, expression and localization of claudins were analyzed, and morphological studies were performed employing transmission electron microscopy and confocal laser scanning microscopy. Cholera toxin induced a marked decrease in transepithelial resistance in the rat jejunal epithelium and an increase in paracellular permeability for sodium fluorescein. Immunoblotting of tight junction proteins revealed an increase in claudin-2 signals, which was verified by confocal laser scanning immunofluorescence microscopy, and a decrease in tricellulin, whereas other tight junction proteins remained unchanged. Transmission electron microscopy showed a reduction in the number of microvilli after incubation with cholera toxin. Moreover, cholera toxin led to a widening of the intercellular space between enterocytes. In accordance with the commonly known prosecretory effect of cholera toxin, our study revealed a complementary effect on small intestinal barrier function and integrity, which might constitute a pathomechanism with high relevance for prevention and therapeutic approaches.

Аннотация

Токсин холеры вызывает секрецию хлоридов в кишечнике. В последние годы при воздействии на эпителиальный барьер сообщалось о синергетической совместной регуляции транспортеров и белков плотных контактов. Наше текущее исследование сосредоточено на анализе влияния холерного токсина на трансэпителиальную резистентность и на белки плотных контактов, последние, известные как структурные корреляты барьерной функции. Перевязанные сегменты тощей кишки крысы инъецировали забуференным раствором, содержащим холерный токсин (1 мкг/мл) и инкубируют 4 ч. Впоследствии те же образцы тканей были помещены в камеры Уссинга, и холерный токсин (1 мкг/мл) добавляли на апикальную сторону. Трансэпителиальная резистентность и проницаемость флуоресцеина натрия (376 Да) были проанализированы. Впоследствии ткани были удалены, экспрессия и локализация клаудинов были проанализированы, а морфологические исследования проводились с использованием просвечивающей электронной микроскопии и конфокальной лазерной сканирующей микроскопии. Холерный токсин индуцировал заметное снижение трансэпителиального сопротивления в эпителии тощей кишки крыс и увеличение параклеточной проницаемости для флуоресцеина натрия. Иммуноблоттинг белков плотных контактов выявил усиление сигналов клаудина-2, что было подтверждено конфокальной лазерной сканирующей иммунофлуоресцентной микроскопией и снижение уровня трицеллюлина, в то время как другие белки плотных контактов остались без изменений. Просвечивающая электронная микроскопия показала уменьшение количества микроворсинок после инкубации с холерным токсином. Более того, токсин холеры привел к расширению межклеточного пространства между энтероцитами. В соответствии с общеизвестным просекреторным эффектом холерного токсина, наше исследование выявило дополнительный эффект на барьер тонкого кишечника функции и целостности, которые могут составлять патомеханизм, имеющий большое значение для профилактических и терапевтических подходов.

Research Article

Isoform-Specific Na,K-ATPase Alterations Precede Disuse-Induced Atrophy of Rat Soleus Muscle

Violetta V. Kravtsova,¹ Vladimir V. Matchkov,² Elena V. Bouzinova,²
 Alexander N. Vasiliev,¹ Irina A. Razgovorova,¹ Judith A. Heiny,³ and Igor I. Krivoi¹

¹St. Petersburg State University, 7/9 University emb., St. Petersburg 199034, Russia

²Aarhus University, Ole Worms Alle bygn. 4, 1163, C 8000 Aarhus, Denmark

³University of Cincinnati College of Medicine, Cincinnati, OH 45267, USA

This study examines the isoform-specific effects of short-term hindlimb suspension (HS) on the Na,K-ATPase in rat soleus muscle. Rats were exposed to 24–72 h of HS and we analyzed the consequences on soleus muscle mass and contractile parameters; excitability and the resting membrane potential (RMP) of muscle fibers; the electrogenic activity, protein, and mRNA content of the $\alpha 1$ and $\alpha 2$ Na,K-ATPase; the functional activity and plasma membrane localization of the $\alpha 2$ Na,K-ATPase. Our results indicate that 24–72 h of HS specifically decreases the electrogenic activity of the Na,K-ATPase $\alpha 2$ isozyme and the RMP of soleus muscle fibers. This decrease occurs prior to muscle atrophy or any change in contractile parameters. The $\alpha 2$ mRNA and protein content increased after 24 h of HS and returned to initial levels at 72 h; however, even the increased content was not able to restore $\alpha 2$ enzyme activity in the disused soleus muscle. There was no change in the membrane localization of $\alpha 2$ Na,K-ATPase. The $\alpha 1$ Na,K-ATPase electrogenic activity, protein and mRNA content did not change. Our findings suggest that skeletal muscle use is absolutely required for $\alpha 2$ Na,K-ATPase transport activity and provide the first evidence that Na,K-ATPase alterations precede HS-induced muscle atrophy.

Аннотация

В этой работе изучены изоформ-специфические эффекты краткосрочного вывешивания конечностей (HS) на Na,K-АТФазу в камбаловидной мышце крысы. Крыс подвергали воздействию HS в течение 24–72 ч и мы анализировали его влияние на массу камбаловидной мышцы и сократительные параметры; возбудимость и мембранный потенциал покоя (МПП) мышечных волокон; электрогенную активность, уровень белка и содержание мРНК $\alpha 1$ - и $\alpha 2$ -Na,K-АТФазы; функциональную активность и локализацию в плазматической мембране $\alpha 2$ -Na,K-АТФазы. Наши результаты показывают, что после 24–72 ч HS специфически снижаются электрогенная активность $\alpha 2$ -Na,K-АТФазы и МПП волокон камбаловидной мышцы. Это снижение предшествует атрофии мышц и изменению сократительных параметров. Уровень мРНК и белка $\alpha 2$ -Na,K-АТФазы увеличивается через 24 ч HS и возвращается к исходному уровню через 72 ч, что, однако не способно восстановить активность $\alpha 2$ -Na,K-АТФазы в механически разгруженной мышце. Мембранная локализация $\alpha 2$ -Na,K-АТФазы не изменялась. Не изменялись электрогенная активность, содержание белка и мРНК $\alpha 1$ -Na,K-АТФазы. Наши результаты показывают, что функционирование скелетных мышц абсолютно необходимо для поддержания транспортной активности $\alpha 2$ -Na,K-АТФазы и впервые демонстрируют, что нарушения Na,K-АТФазы предшествуют вызываемой HS мышечной атрофии.

Role of Cholesterol in the Maintenance of Endplate Electrogenesis in Rat Diaphragm

V. V. Kravtsova, A. M. Petrov*, A. N. Vasil'ev, A. L. Zefirov*, and I. I. Krivoi

Methyl- β -cyclodextrin (0.1 mM) reduced resting potential of muscle fibers and abolished local endplate membrane hyperpolarization in rat diaphragm. This effect was associated with selective reduction of electrogenic activity of $\alpha 2$ -isoform of Na,K-ATPase without changes in the level of intracellular acetylcholine. Experiments with cholesterol marker filipin showed that methyl- β -cyclodextrin in this dose induced cholesterol translocation from lipid rafts to liquid phase of the membrane without its release into extracellular space. This modification of lipid rafts by methyl- β -cyclodextrin presumably impaired the mechanism maintaining electrogenesis in endplates mediated by modulation of Na,K-ATPase by non-quantum acetylcholine. Cholesterol can serve as a molecular component of this mechanism.

Аннотация

Метил- β -циклодекстрин (0.1 mM) снижает потенциал покоя мышечных волокон и устраняет локальную гиперполяризацию мембраны концевой пластинки в диафрагме крысы. Этот эффект связан с избирательным снижением электрогенной активности $\alpha 2$ -изоформы Na,K-АТФазы без изменения уровня внеклеточного ацетилхолина. Эксперименты с маркером холестерина филипином показывают, что метил- β -циклодекстрин в этой концентрации индуцирует транслокацию холестерина из липидных рафтов в жидкую фазу мембраны без выхода его во внеклеточное пространство. Предположительно, эта модификация липидных рафтов метил- β -циклодекстрином нарушает механизм поддержания электрогенеза мембраны концевой пластинки, опосредованный модуляцией Na,K-АТФазы неквантовым ацетилхолином. Холестерин может служить молекулярным компонентом этого механизма.

PHYSIOLOGY

Abnormal Membrane Localization of $\alpha 2$ Isoform of Na,K-ATPase in *m. soleus* of Dysferlin-Deficient Mice

V. V. Kravtsova¹, E. V. Bouzina², V. V. Machkov², N. A. Timonina¹, G. F. Zakyrjanova^{3,4}, A. L. Zefirov⁴, and I. I. Krivoi¹

Dysferlin protein plays a key role in the multimolecular complex responsible for the maintenance of sarcolemma integrity and skeletal muscle cell functioning. We studied the membrane distribution of nicotinic acetylcholine receptors and $\alpha 2$ isoform of Na,K-ATPase in motor endplates of *m. soleus* in dysferlin-deficient Bla/J mice (a dysferlinopathy model). Endplates of Bla/J mice were characterized by increased area (without changes in fragmentation degree) and reduced density of the membrane distribution of nicotinic acetylcholine receptors in comparison with the corresponding parameters in control C57Bl/6 mice. The density of the membrane distribution of $\alpha 2$ isoform of Na,K-ATPase was also reduced, but the level of the corresponding mRNA remained unchanged. It can be hypothesized that abnormal membrane localization of $\alpha 2$ isoform of Na,K-ATPase results from adaptive skeletal muscle remodeling under conditions of chronic motor dysfunction.

Аннотация

Дисферлин является ключевым белком мультимолекулярного комплекса, ответственного за поддержание целостности сарколеммы и нормальное функционирование скелетных мышечных клеток. В работе исследовано распределение никотиновых холинорецепторов и $\alpha 2$ -изоформы Na,K-АТФазы в мембране моторных концевых пластинок *m. soleus* мышцей Bla/J с дефицитом дисферлина (одна из моделей дисферлинопатии) по сравнению с контрольными мышцами C57Bl/6. Концевые пластинки мышцей Bla/J характеризовались увеличением площади (степень фрагментации не изменялась), а также снижением плотности мембранного распределения никотиновых холинорецепторов и $\alpha 2$ -изоформы без изменения уровня её мРНК. Предположительно, нарушение мембранной локализации $\alpha 2$ -изоформы Na,K-АТФазы является результатом адаптационных перестроек в скелетной мышце в условиях хронической двигательной дисфункции.

EXPERIMENTAL
ARTICLES

The Structural and Functional Characteristics of the Motor End Plates of Dysferlin-Deficient Mice

V. V. Kravtsova^a, N. A. Timonina^a, G. F. Zakir'yanova^b, A. V. Sokolova^c,
V. M. Mikhailov^c, A. L. Zefirov^d, and I. I. Krivoi^{a,1}

^a*St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia*

^b*Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, Federal Research Center Kazan Scientific Center, Russian Academy of Sciences, Kazan, Russia*

^c*Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia*

^d*Kazan State Medical University, Kazan, Russia*

Received April 9, 2018

Abstract—The molecular mechanisms that underlie neuromuscular junction plasticity are complex and remain to be fully elucidated. Experimental models of various forms of impaired motor activity may be promising for their study. The dysferlin protein plays a key role in the multimolecular complex, which maintains sarcolemma integrity and the functioning of skeletal muscle cells. We studied the structural and functional characteristics of the diaphragm muscle motor end plates of dysferlin-deficient Bla/J mice (a model of dysferlinopathy), dystrophin-deficient mdx mice (a model of Duchenne muscular dystrophy), and control C57Bl/6 mice. Increased end plate fragmentation and a decrease in the area of individual fragments were observed in mdx mice and absent in Bla/J mice, which indicates a difference in these models of myodystrophy from these characteristics. However, end plates of both mice lines were characterized by a decrease in the density of distribution of nicotinic acetylcholine receptors, as well as by membrane depolarization, presumably, due to altered functional interaction between the $\alpha 2$ isoform of Na,K-ATPase and the nicotinic acetylcholine receptors.

Аннотация

Молекулярные механизмы, лежащие в основе пластичности нервно-мышечного соединения, очень сложны и во многом остаются неизвестными. Перспективными для их изучения могут быть экспериментальные модели различных форм нарушений двигательной активности. Дисферлин является ключевым белком мультимолекулярного комплекса, ответственного за поддержание целостности сарколеммы и нормальное функционирование скелетных мышечных клеток. В работе исследованы структурно-функциональные характеристики моторных концевых пластинок диафрагмальных мышц мышей Bla/J с дефицитом дисферлина (модель дисферлинопатии), мышей mdx с дефицитом дистрофина (модель миодистрофии Дюшенна) и контрольных мышей C57Bl/6. Усиление фрагментации концевых пластинок и снижение площадей отдельных фрагментов были выражены у мышей mdx и не наблюдались у мышей Bla/J, что свидетельствует о различии этих моделей миодистрофии по данным характеристикам. В то же время, концевые пластинки мышей обеих линий характеризовались снижением плотности распределения никотиновых холинорецепторов; наблюдалась также деполяризация мембраны концевой пластинки, предположительно, вследствие нарушения функционального взаимодействия $\alpha 2$ -изоформы Na,K-АТФазы с никотиновыми холинорецепторами.

Low Ouabain Doses and AMP-Activated Protein Kinase as Factors Supporting Electrogenesis in Skeletal Muscle

V. V. Kravtsova¹, N. A. Vilchinskaya², V. L. Rozlomii¹, B. S. Shenkman², and I. I. Krivoi^{1,a*}

¹St. Petersburg State University, Department of General Physiology, 199034 St. Petersburg, Russia

²Institute of Biomedical Problems, Laboratory of Myology, Russian Academy of Sciences, 123007 Moscow, Russia

^ae-mail: iikrivoi@gmail.com

Received February 11, 2019

Revised May 24, 2019

Accepted June 7, 2019

Abstract—Many motor disorders are associated with depolarization of the membrane of skeletal muscle fibers due to the impaired functioning of Na,K-ATPase. Here, we studied the role of ouabain (specific Na,K-ATPase ligand) and AMP-activated protein kinase (key regulator of muscle metabolism) in the maintenance of muscle electrogenesis; the levels of these endogenous factors are directly related to the motor activity. After 4-day intraperitoneal administration of ouabain (1 µg/kg daily), a hyperpolarization of sarcolemma was registered in isolated rat diaphragm muscles due to an increase in the electrogenic activity of Na,K-ATPase. In acute experiments, addition of nanomolar ouabain concentrations to the bathing solution resulted in the muscle membrane hyperpolarization within 15 min. The effect of ouabain reversed to membrane depolarization with the increase in the external potassium concentration. It is possible that Na,K-ATPase activation by ouabain may be regulated by such factors as specific subcellular location, interaction with molecular partners, and changes in the ionic balance. Preventive administration of the AMP-activated protein kinase activator AICAR (5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-β-D-ribofuranoside; 400 mg/kg body weight daily for 7 days) in chronic experiments resulted in the stabilization of the endplate structure and abolishment of depolarization of the rat soleus muscle membrane caused by the motor activity cessation. The obtained data can be useful for creating approaches for correction of muscle dysfunction, especially at the early stages, prior to the development of muscle atrophy.

Аннотация

Различные виды двигательной дисфункции сопровождаются устойчивой деполяризацией мембраны скелетных мышечных волокон за счет нарушения функционирования Na,K-АТФазы. Нами впервые исследована возможность участия в поддержании мышечного электрогенеза эндогенных факторов, уровень которых непосредственно связан с двигательной активностью: уабаина (специфического лиганда Na,K-АТФазы) и АМФ-активируемой протеинкиназы (ключевого регулятора мышечного метаболизма). В изолированных диафрагмальных мышцах крыс после введения уабаина (1 мкг/кг/день в течение 4-х суток) зарегистрирована гиперполяризация сарколеммы за счет увеличения электрогенной активности Na,K-АТФазы. Гиперполяризация, развивающаяся уже через 15 мин, показана и в острых опытах с добавлением наномолярных концентраций уабаина в раствор. При увеличении концентрации наружного калия менялся знак действия уабаина и наблюдалась только деполяризация мембраны. Специфическая субклеточная локализация, наличие определенных молекулярных партнеров, а также изменение ионного баланса рассматриваются в качестве возможных факторов реализации активирующего Na,K-АТФазу действия уабаина. В экспериментах с превентивным введением АИКАР (активатор АМФ-активируемой протеинкиназы, 400 мг/кг/день в течение 7 сут) показана стабилизация структуры концевых пластинок и отсутствие деполяризации мембраны камбаловидной мышцы крысы, вызываемой прекращением двигательной активности. Полученные новые факты могут быть полезными с точки зрения поиска путей коррекции мышечной дисфункции, в том числе на ее ранних этапах, предшествующих развитию выраженной атрофии.

Low Ouabain Concentrations Stimulate Epithelial Barrier Formation in IPEC-J2 Cells

A. A. Fedorova^a, V. Cornelius^b, S. Amasheh^b, I. I. Krivov^a, and A. G. Markov^{a*}

^a Department of General Physiology, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

^b Institute of Veterinary Physiology, Department of Veterinary Medicine, Freie Universität, Berlin, Germany

*e-mail: markov_51@mail.ru

Received September 14, 2018

Revised October 4, 2018

Accepted February 4, 2019

DOI: 10.1134/S002209301903013X

Na,K-ATPase is an integral protein that maintains Na⁺ and K⁺ ion gradients across the plasma membrane by active transport, thus providing membrane potential, excitability and the driving force for numerous transmembrane transport mechanisms. Besides, owing to a series of structural domains, the Na,K-ATPase is able to form multimolecular complexes and participate as a scaffold in the formation of functional cell microdomains, intercellular interactions, regulatory and signaling functions [1]. In epithelial cells, the Na,K-ATPase is not only involved in the realization of transport properties of these cells but also functions as an important regulator of the epithelial phenotype. This ability is ensured by the fact that the Na,K-ATPase participates both in the formation of tight junctions and the regulation of their molecular organization and permeability [2, 3]. Ouabain, a Na,K-ATPase inhibitor whose α -subunit serves as its specific receptor, is the main tool in such investigations. At present, the existence of an endogenous ouabain analogue has

been evidenced. Being synthesized in the adrenal cortex and hypothalamus, it circulates in nanomolar concentrations and is considered as an important physiological regulator [1].

Micromolar concentrations of ouabain, which block the activity of the Na,K-ATPase, have been shown to disrupt the molecular organization of tight junctions in epithelial cells and to decrease transepithelial resistance (TER) [2]. By contrast, at nanomolar concentrations comparable to the endogenous ouabain level, it has an opposite effect accompanied by an increase in TER. Such effects of ouabain are shown in the Madin-Darby canine kidney (MDCK II) cell line [2] and Sertoli cells [3], supporting thereby the involvement of endogenous ouabain in the regulation of epithelial cell phenotype. In the present work, we investigated for the first time the effect of nanomolar ouabain concentrations on TER using the porcine jejunal cell line IPEC-J2. These cells are considered as a promising model for studying various events in human gastrointestinal tract [4].

252

НИЗКИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ УБАИНА СТИМУЛИРУЮТ ФОРМИРОВАНИЕ ЭПИТЕЛИАЛЬНОГО БАРЬЕРА В ЛИНИИ КЛЕТОК IPEC-J2

© 2019 г. А. А. Федорова¹, V. Cornelius², S. Amasheh², И. И. Кривов¹, А. Г. Марков^{1,*}

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

² Institute of Veterinary Physiology, Department of Veterinary Medicine, Freie Universität, Berlin, Germany

*e-mail: markov_51@mail.ru

Поступила в редакцию 14.09.2018 г.

После доработки 04.10.2018 г.

Принята к публикации 04.02.2019 г.

DOI: 10.1134/S0044452919030069

Na,K-АТФаза — интегральный белок, поддерживающий трансмембранные градиенты Na⁺ и K⁺ за счет активного транспорта этих ионов, что обеспечивает мембранный потенциал и возбудимость, а также ряд других транспортных механизмов клетки. Кроме того, благодаря ряду структурных доменов Na,K-АТФаза способна образовывать мультимолекулярные комплексы и участвовать в качестве скелета в формировании функциональных микродоменов клетки, межклеточных взаимодействиях, а также выполнять регуляторную и сигнальную функции [1]. В эпителиальных клетках Na,K-АТФаза не только участвует в осуществлении транспортных свойств этих клеток, но является также важным регулятором фенотипа эпителия. Эта способность обеспечивается тем, что Na,K-АТФаза участвует в формировании плотных контактов, в регулировании их молекулярной организации и проницаемости [2, 3]. В качестве основного инструмента в таких исследованиях применяют ингибитор Na,K-АТФазы убаина, специфическим рецептором для которого является α -субъединица Na,K-АТФазы. В настоящее время доказано существование эндогенного аналога убаина, который синтезируется в коре надпочечников и в гипоталамусе, циркулирует в наномолярном диапазоне концентраций и рассматривается в качестве важного физиологического регулятора [1].

Убаин в микромолярных концентрациях, блокируя активность Na,K-АТФазы, нарушает молекулярную организацию плотных контактов в эпителиальных клетках и вызывает снижение трансэпителиального сопротивления (ТЭС) [2]. Напротив, убаин в наномолярных концентрациях, сопоставимых с уровнем эндогенного убаина, оказывает противоположное действие, сопровождающееся увеличением ТЭС. Такие эффекты убаина показаны в клеточной линии почки собаки (MDCK II) [2] и клетках Сертоли [3], что подтвер-

ждает возможность участия эндогенного убаина в регуляции фенотипа эпителия. В настоящей работе мы впервые исследовали влияние убаина в наномолярных концентрациях на ТЭС с использованием линии клеток тощей кишки свиньи (IPEC-J2), которые рассматривают как перспективную модель для изучения процессов в желудочно-кишечном тракте человека [4].

Клетки IPEC-J2 были культивированы в среде DMEM/F12 (1:1), содержащей стабилизатор глутамин (Biocrom, Germany), а также дополненной 1% раствором антибиотиков пенициллина и стрептомицина и 10%-ой сывороткой крови свиньи (Biocrom). Культура клеток была выращена при температуре 37°C в атмосфере 5% CO₂. Клетки (3 × 10⁶ клеток/посев) были высеяны на специализированные мембранные фильтры диаметром 12 мм, размером пор 0.4 мкм (Merck Millipore Ltd., Darmstadt, Germany). Клетки культивировали в среде без убаина (контроль), а также в средах, содержащих убаин (1, 10 и 100 нМ). Замена среды проводилась каждые два-три дня. ТЭС измеряли при помощи усилителя EVOM (World Precision Instruments, USA). Все приемы работы соответствовали нормам международного и российского законодательства. Статистический анализ проводился с использованием множественного t-теста в программном обеспечении GraphPad Prism версия 6.01 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Для обработки данных все значения ТЭС были нормализованы по площади фильтра; значения сопротивлений раствора и фильтра вычитались из зарегистрированных значений. В тексте и на рисунках приведены средние значения величин с их ошибками (m ± SEM). Уровень значимости $p < 0.05$ принимался как статистически значимый. Убаин и все прочие применяемые вещества были производства Sigma-Aldrich.

В контроле наблюдалось постепенное увеличение значений ТЭС от 570 ± 260 до 1790 ± 220 Ом · см²

Basolateral pressure challenges mammary epithelial cell monolayer integrity, in vitro

Katharina S. Mießler · Constanze Vitzthum · Alexander G. Markov · Salah Amasheh

Received: 23 November 2016 / Accepted: 31 July 2017
© Springer Science+Business Media B.V. 2017

Abstract Mammary gland epithelium is physiologically exposed to variations of hydrostatic pressure due to accumulation of milk and removal by suckling and mechanical milking. Integrity of the mammary gland epithelium primarily relies on the tight junction. To analyze pressure-induced effects on the tight junction, we established a modified Ussing chamber and tested the hypothesis if hydrostatic pressure on the basal side of the epithelium is able to affect barrier properties in a mammary epithelial cell model, in vitro. Therefore, a conventional Ussing chamber was modified by an additional tube system to apply hydrostatic pressure. Monolayers of the mammary epithelial cell line HC11 were mounted in the modified Ussing chambers and incubated with increasing basal hydrostatic pressure. Transepithelial resistance and short circuit current were recorded and compared to controls. Hydrostatic pressure was stably applied and incubation steps of 30 min were technically feasible,

leading to a decrease of transepithelial resistance and an increase of short circuit current in all monolayers. In a series of experiments simulating the physiological exposure time by short intervals of 5 min, these electrophysiological findings were also observed, and monolayer integrity was not significantly perturbed as analyzed by fluorescence immunohistochemistry selectively staining tight junction proteins. Moreover, electrophysiology demonstrated reversibility of effects. In conclusion, the modified Ussing chamber is an adequate method to analyze the effects of hydrostatic pressure on epithelial cell monolayers, in vitro. Both, the reduction of transepithelial resistance and the increase of short circuit current may be interpreted as protective reactions.

Keywords Barrier function · Tight junction · Ussing chamber · Hydrostatic pressure · Mammary gland · HC11

Аннотация

Эпителий молочной железы физиологически подвержен колебаниям гидростатического давления из-за накопления молока и его удаления при кормлении грудью и механическом доении. Целостность эпителия молочной железы в первую очередь зависит от плотных контактов. Для анализа воздействия давления на герметичность стыка, мы установили модифицированную камеру Уссинга и проверили гипотезу, если гидростатическое давление на базальная сторона эпителия способна воздействовать на барьерные свойства в модели эпителиальных клеток молочной железы, in vitro. Поэтому обычная камера Уссинга была модифицирована дополнительной системой трубок для нанесения гидростатического давления. Монослои молочной железы эпителиальной клеточной линии HC11 смонтировали в модифицированных камерах и инкубировали с увеличенным базальным гидростатическим давлением. Трансэпителиальное сопротивление и ток короткого замыкания были записаны и сравнены с контролем. Стабильно прикладывалось гидростатическое давление и краткие инкубации продолжительностью 30 мин были проведены, что приводит к снижению трансэпителиального сопротивления и увеличение тока короткого замыкания во всех монослоях. В серии экспериментов по моделированию физиологического время воздействия короткими интервалами по 5 мин, также наблюдали электрофизиологические изменения и целостность монослоя существенно не нарушалась. Кроме того, электрофизиология показала обратимость эффектов. В заключение, доработанная камера Уссинга является адекватным методом для анализа эффектов гидростатическое давление на монослои эпителиальных клеток, in vitro. Снижение трансэпителиального сопротивления и увеличение тока короткого замыкания может быть интерпретировано как защитные реакции.