

УДК 612.362/.364:577.181.5

Т. Довбинчук, асп., А. Базан, студ., Г. Толстанова, д-р біол. наук  
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ,  
Л. Закордонець, канд. мед. наук  
Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, Київ

## РІВЕНЬ ТРАНСПОРТНИХ ПРОТЕЇНІВ AQP8 ТА CFTR В СЛИЗОВІЙ ОБОЛОНЦІ ТОВСТОЇ КИШКИ ЩУРІВ ПІСЛЯ ВВЕДЕННЯ АНТИБІОТИКА ЦЕФТРІАКСОНА

*Антибіотик цефтріаксон цефалоспоринового покоління викликає порушення у транспорті води та електролітів через епітелій товстої кишки. В наших дослідженнях встановлено, що 5- та 14-добове введення цефтріаксону викликає зміни у рівні протеїнів AQP8 та CFTR в слизовій оболонці товстої кишки щурів, що може лежати в основі молекулярних механізмів розв'язку антибіотикасоціюваної діареї.*

**Ключові слова:** товста кишка, цефтріаксон, діарея.

**Вступ.** Всмоктування води в товстій кишці відбувається пасивно за осмотичним градієнтом, який створюється активним транспортом електролітів, переважно, хлориду натрію за двома шляхами: парацелюлярно (через міжклітинні проміжки) та трансцелюлярно за допомогою спеціальних каналів, вбудованих в апікальну та базолатеральну мембрани, що носять назву аквапорини (AQP) [1]. Аквапорини вперше були виявлені у 1991 році [2, 3] являють собою групу невеликих мембранних білків, які забезпечують різним епітеліальним тканинам проникність для води. Усього сімейство аквапоринів налічує 10 членів, з яких більшість проявляють чітку специфічність до тканин [4, 5, 6]. У шлунково-кишковому тракті (ШКТ) аквапорини мають широке розповсюдження, так в ШКТ були знайдені AQP1, AQP3, AQP4, AQP5, AQP7, AQP8, AQP9, які локалізовані в епітеліальних клітинах по всій довжині травної трубки та клітинах травних залоз [7, 8, 9, 10] При цьому, була виявлена потужна роль саме AQP8 у забезпеченні всмоктування води у товстій кишці за нормальних умов та на фоні запальних процесів (виразкового коліту, хвороби Крона тощо) [11]. Нещодавно було показано, що аквапорини не тільки забезпечують водний гомеостаз у товстій кишці, але і відіграють значну роль у патогенезі запальних захворювань кишечника [11].

Рушійною силою для забезпечення транспорту води є електрохімічний градієнт, який створюється за рахунок транспорту іонів. Доведено той факт, що одним з основних факторів, що контролює як електрогенне, так і електронейтральне всмоктування електролітів через епітелій товстої кишки є хлор-селективні канали – трансмембранний регулятор муковісцидоза (CFTR канал) [12]. CFTR є переважаючим Cl<sup>-</sup> каналом в дихальних шляхах, потових залозах та товстій кишці дорослої людини, де він відповідальний за цАМФ- та за Ca<sup>2+</sup>-активовану секрецію хлору [13, 14, 15].

В попередніх дослідженнях нами показано, що введення антибіотику групи цефалоспоринів призводить до розвитку діареї обумовленої зменшенням всмоктування води через епітелій товстої кишки щурів [16]. Проте молекулярний механізм, що лежить в основі даного явища не встановлений.

Тому метою нашої роботи було дослідити рівень протеїнів AQP8 та CFTR каналів в слизовій оболонці товстої кишки щурів після 5-ти та 14-ти денної терапії цефтріаксоном.

**Об'єкт та методи дослідження.** Дослідження проводили на білих лабораторних щурах-самцях лінії Вістар, масою 180-250 г, n=20. Тварин утримували в

стандартних умовах виварію при сталій температурі та вологості повітря.

Контролем слугували щури, яким упродовж 5-ти чи 14-ти діб одноразово вводили 0,1 мл води для ін'єкцій, внутрішньом'язово. Дослідні групи щурів, отримували внутрішньом'язово цефтріаксон (Артеріум, БАТ "Київ-медпрепарат" Україна) в дозі 50 мг/кг, один раз на добу впродовж 5-ти чи 14-ти діб. Відповідно на 6-тий та 15-й день після початку експерименту (першим днем експерименту вважали день початку введення антибіотику) проводили аутопсію.

Щурів умертвляли та вирізали ділянку товстої кишки від анального отвору до сліпої кишки. Обережно зішкрябували поверхневі шари кишки, залишаючи серозну оболонку, зважували та занурювали в рідкий азот.

Ізольовану ділянку товстої кишки гомогенізували в лізуючому буфері (50 мМ трис – HCl, pH 7,4; 150 мМ NaCl, pH 7,4; 1% деоксихолат натрію; 1% SDS; 1% Тритон – 100 з додаванням інгібітора протеаз (Sigma, США) та фосфатаз (10 мМ Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>).

Концентрацію загального білку вимірювали за методом Бредфорд з використанням набору "Bio-Rad для білкового аналізу" (Bio-Rad, США). Розділення та визначення білку (100 мкг заг. білку/зразок) проводили у 15% чи 8% SDS поліакриламідному гелі методом Вестерн блот аналізу з подальшим переносом протеїнів на нітроцелюлозну мембрану. Для визначення рівня протеїнів AQP8 та CFTR в слизовій оболонці товстої кишки використовували антитіла до AQP8 (1:500; Sigma., США) та CFTR (1:500; Sigma., США) відповідно. Надалі інкубували із вторинними HRP – кон'югованими антитілами до AQP8 (1:250; Novus Biology) та CFTR (1:2500; Santa Cruz). Візуалізували Вестерн блот з допомогою ECL – реагенту з 3,3 мкл H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Статистичну обробку даних проводили з використанням програми Statistica 8.0. Для кожної з вибірок перевіряли чи є нормальним розподіл досліджуваного показника, застосовуючи критерій Шапіро-Вілка. За умов нормального розподілу вибірок використовували t тест Стьюдента. Статистично значущою для всіх показників вважали різницю p<0,05.

**Результати та їх обговорення.** Встановлено, що в слизовій оболонці товстої кишки щурів за нормальних умов експресуються аквапоринові канали AQP8 (рис. 1 А,Б). Аналогічні дані були отримані іншими дослідниками [11]. Введення цефтріаксону впродовж 5 днів не викликало статистично вірогідних змін у рівні протеїну AQP8 в слизовій оболонці товстої кишки щурів (рис 1А).

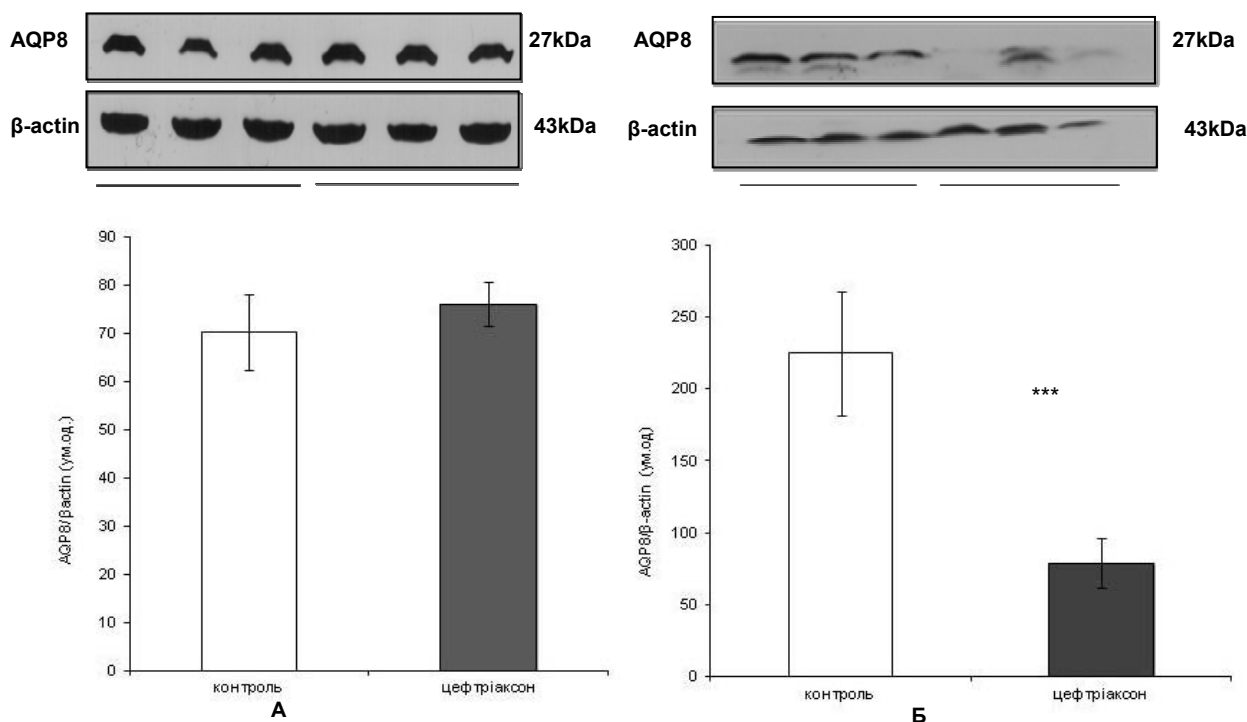


Рис.1. Рівень протеїну AQP8 в слизовій оболонці товстої кишки щурів, після 5-(А) та 14-(Б) добового введення цефтріаксону (50 мг/кг, внутрішньом'язово). Вестерн блот аналіз

\*\*\* –  $p < 0,001$  відносно показників в контрольній груп

Проте, 14-добове введення цефтріаксону асоціювалось зі зменшенням в 2,9 разів ( $p < 0,001$ ) рівня протеїну AQP8 порівняно з контрольною групою (рис. 1Б). В попередніх дослідженнях нами встановлено зменшення всмоктування води через епітелій товстої кишки щурів, як після 5- так і 14-добового введення цефтріаксону, що проявлялось клінічними ознаками діареї у 15% тварин [17]. Відповідно до отриманих нами даних можна припустити, що зменшення сумарного транспорту води після 5-добового введення цефтріаксону пов'язано з порушенням всмоктування електролітів. Після 14-добового введення цефтріаксону ефект посилюється за рахунок зменшення кількості каналів для транспорту води.

Важливу роль в регуляції сумарного транспорту іонів через епітелій товстої кишки відіграють цАМФ-залежні хлор-селективні канали – CFTR [18]. Зміни в їх активності призводять до порушення всмоктування натрію через електрогенні натрієві канали (ENaC) та  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  обмінник NHE3, що призводить до зсуву напрямку транспорту через епітелій товстої кишки в бік секреції [18, 12, 19].

Дані літератури свідчать про те, що в епітелії товстої кишки відбувається регуляція  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  та  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  обмінників за участю CFTR, що, в свою чергу, впливає на електронейтральне всмоктування  $\text{NaCl}$ , а також на внутрішньоклітинне рН та рН просвіту товстої кишки та інших відділів ШКТ [20]. Більш того, стимуляції секреції хлору через CFTR канали – є центральним механізмом ентеротоксин-викликаного діареї [21].

В наших попередніх дослідженнях було показано порушення транспорту іонів  $\text{Na}$ ,  $\text{K}$  та  $\text{Cl}$  через епітелій товстої кишки щурів після антибіотикотерапії з цефтріаксоном [22]. Ми припустили, що це може бути пов'язано зі змінами у експресії CFTR каналів в слизовій оболонці товстої кишки.

Введення щурам цефтріаксону впродовж 5 діб призводило до підвищення в 1,5 разів рівня протеїну CFTR в слизовій оболонці товстої кишки щурів (рис.2А).

На відміну від 5-добової дії, після 14-добового введення антибіотику не спостерігалось вірогідних змін у рівні протеїну CFTR каналу (рис.2Б).

Активність CFTR каналів в більшій мірі залежить від їх кількості на поверхні цитоплазматичної мембрани, а не від загальної кількості протеїну CFTR [23]. Тому отримана наша відсутність змін у рівні даного протеїну через 14-добового введення цефтріаксону не виключає участі даного каналу в механізмах порушеного транспорту води та електролітів. Необхідні додаткові дослідження направлені на визначення клітинної локалізації CFTR каналів для відповіді на це питання.

**Висновки.** Вперше встановлено, що 5- та 14-добове введення цефтріаксону викликає зміни у рівні протеїнів AQP8 та CFTR в слизовій оболонці товстої кишки щурів, що може лежати в основі молекулярних механізмів розвитку антибіотикасоційованої діареї.

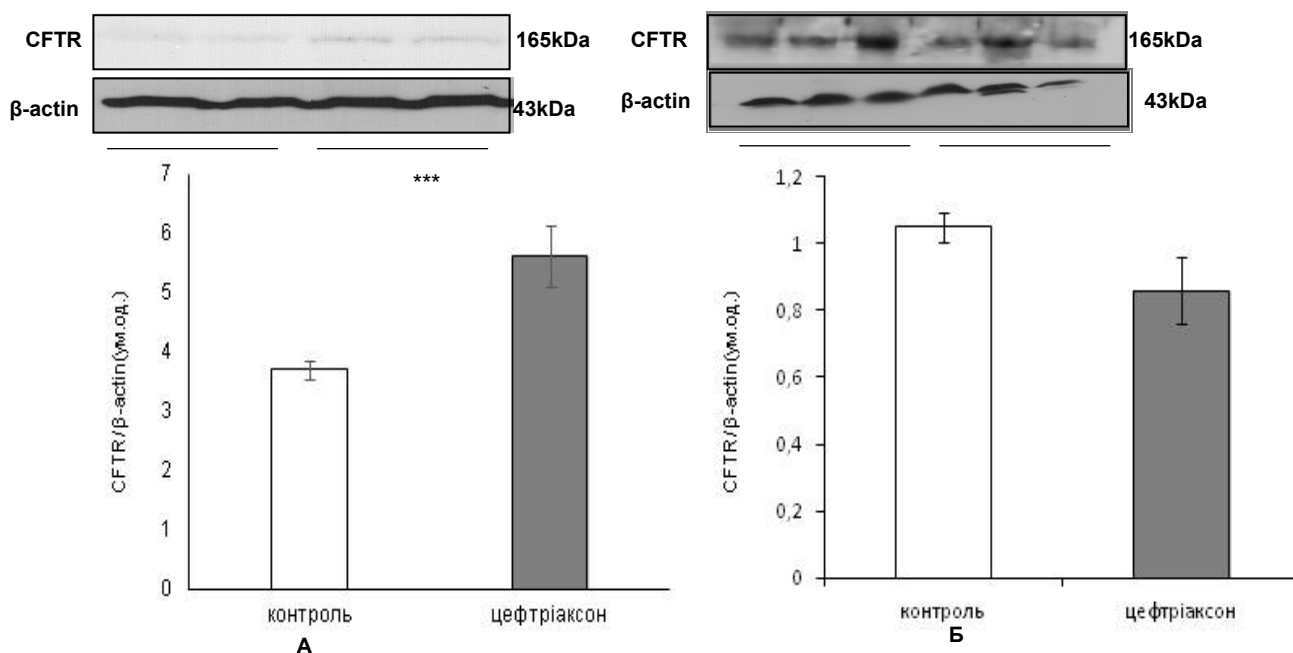


Рис. 2. Рівень протеїну CFTR в слизовій оболонці товстої кишки щурів після 5- (А) та 14- (Б) добового введення антибіотику цефтріаксону (50 мг/кг, в/м). Вестерн блот аналіз

\*\*\* –  $p < 0,001$  відносно показників в контрольній груп

#### Список використаної літератури

- Kunzelmann K. Electrolyte transport in the mammalian colon: mechanisms and implications for disease // *K. Kunzelmann, M. Mallf // Physiological Reviews.* – 2002. – Vol. 82. – P. 245-289.
- Preston G.M., Agre P. Isolation of the cDNA for erythrocyte integral membrane protein of 28 kilodaltons: member of an ancient channel family // *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America.* – 1991. – Vol. – 88. – P. 11110-11114.
- Preston G.M., Carroll T.P., Guggino W.B. et al Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein // *Science.* – 1992. – Vol. 256. – P. 385-7.
- Nielsen S., Frokiaer J., Marples D. et al Aquaporins in the kidney: From molecules to medicine // *Physiology Review.* – 2002. – Vol. 82. – P. 205-44.
- Ma TH, Verkman AS. Aquaporin water channels in gastrointestinal physiology // *J Physiol.* – 1999. – Vol. – 517. – P. 317-26.
- Nielsen S., King L.S., Christensen B.M. et al Aquaporins in complex tissues. II. Subcellular distribution in respiratory and glandular tissues of rat // *American Journal Physiology.* – 1997. – Vol. – 273. – P. 1549-61
- Nielsen S., Nagelhus E. A., Amiry-Moghaddam M., Bourque C., Agre P., Ottersen O. P. Specialized Membrane Domains for Water Transport in Glial Cells: High-Resolution Immunogold Cytochemistry of Aquaporin-4 in Rat Brain // *The Journal of Neuroscience.* – 1997, Vol. – 17, №1. – P. 171-180;
- Hasegawa T., TANII H., SUZUKI M., TANAKA S. Regulation of Water Absorption in the Frog Skins by Two Vasotocin-Dependent Water-Channel Aquaporins, AQP-h2 and AQP-h3 // *Endocrinology.* – 2003, Vol. – 144, №9. – P. 4087-4096.
- Ma T., Verkman A.S. Topical Review Aquaporin water channels in gastrointestinal physiology // *Journal of Physiology.* – 1999. – Vol. – 517, №2. – P. 317-326.
- Grazia P. Nicchia, Antonio Frigeri, Beatrice Nico, Domenico Ribatti, and Maria Svetlo Tissue Distribution and Membrane Localization of Aquaporin-9 Water Channel: Evidence for Sex-linked Differences in Liver // *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry.* – 2001. Vol. 49, №12. – P. 1547-1556.
- Ricanek P., Lunde L., Frye S., Støen M., Nygård S., Morth J., Rydning A., Vatn M., Amiry-Moghaddam M., Tønnum T. Reduced expression of aquaporins in human intestinal mucosa in early stage inflammatory bowel disease // *Clinical and Experimental Gastroenterology.* – 2015. – Vol. 8. – P. 49-67.
- Kunzelmann K., M. Mall. Electrolyte Transport in the Mammalian Colon: Mechanisms and Implications for Disease // *Physiology Review.* – 2002. – Vol. 82. P. 245-289.

- Barrett Ke And Keely Sj. Chloride secretion by the intestinal epithelium: molecular basis and regulatory aspects // *Annual Review Physiology.* – 2000. – Vol. 62. – P. 535-572.
- Mall M, Bleich M, Greger R, Schu" Rlein M, Ku" Hr J, Seydewitz Hh, Brandis M, And Kunzelmann K. Cholinergic ion secretion in human colon requires co-activation by cAMP // *American Journal Physiology Gastrointestinal Liver Physiology.* – 1998. – Vol. 275. – P. G1274-G1281.
- Strabel D. And Diener M. Evidence against direct activation of chloride secretion by carbachol in the rat distal colon – *European Journal Pharmacology.* – 1995. – Vol. 274. – P. 181-191.
- Довбинчук Т., Закордонєць Л, Берегова Т, Толстанова Г. Транспорт води через епітелій товстої кишки щурів за дії антибіотику цефтріаксону // *Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка "Біологія".* – 2014. – Т. 3, №68. – С. 29-34.
- Dovbynchuk T., Dranitsina A., Chervinska T., Zakordonets L., Beregova T., Ostapchenko L., Tolstanova G. The colonic ion transport and mucus secretion during treatment with broad spectrum antibiotic ceftriaxone // *Digestive Diseases Science.* Budapest, Hungary. – 2014. – Vol. 59, №8. – P. 1652-1653.
- Greger R. Role of CFTR in the colon // *Annu. Rev. Physiol.* – 2000. – Vol. 62. – P. 467-91.
- Mall M. Pharmacotherapy of the Ion Transport Defect in Cystic Fibrosis // *American Journal Respired Medicine.* – 2003. Vol. – 2, №4. – P. 299-309.
- Poulsen J.H., Fischer H., Illek B., Machen T.E. Bicarbonate conductance and pH regulatory capability of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator // *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America.* – 1994. – vol. 91, №. 12.
- Sonawane N. D., Hu J., Muanprasat C., Verkman A. S. Luminally active, nonabsorbable CFTR inhibitors as potential therapy to reduce intestinal fluid loss in cholera // *The FASEB Journal.* – 2005. – Published online №29.
- Довбинчук Т.В., Закордонєць Л.В., Путніков А.В., Варенюк І.М., Тяпко О.П., Рослова Н.М., Сергійчук Т.М., Линчак О.В., Дзержинський М.Е., Берегова Т.В., Толстанова Г.М. Різонаправлений ефект антибіотиків групи макролідів та цефалоспоринів на транспорт води та електролітів через епітелій товстої кишки щурів // *Фізіологічний журнал.* – 2015. – №6.
- Neil B.A., Tamas J., et al Regulation of Plasma Membrane Recycling by CFTR // *Science.* – 1992. – Vol. 256, №5056. – С. 530.

Надійшла до редколегії 19.10.15

Т. Довбинчук, асп., А. Базан, студ., А. Толстанова, д-р биол. наук  
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина,  
Л. Закордонець, канд. мед. наук  
Национальный медицинский университет им. О.О. Богомольца, Киев, Украина

### УРОВЕНЬ ТРАНСПОРТНЫХ ПРОТЕИНОВ AQP8 И CFTR В СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКЕ ТОЛСТОЙ КИШКИ КРЫС ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ АНТИБИОТИКА ЦЕФТРИАКСОНА

*Антибиотикотерапия цефалоспорином III поколения цефтриаксоном вызывает нарушения в транспорте воды и электролитов через эпителий толстой кишки. В наших исследованиях установлено, что 5-ти и 14-суточное введение цефтриаксона вызывает изменения в уровне протеинов AQP8 и CFTR в слизистой оболочке толстой крыс, может лежать в основе молекулярных механизмов развития антибиотикоассоциированной диареи.*

*Ключевые слова: толстая кишка, цефтриаксон, диарея.*

T. Dovbynchuk PhD stud., A. Bazan stud., G. Tolstanova DSc.  
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine,  
L. Zakordonets, PhD  
O.O. Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine

### LEVEL AND TRANSPORT PROTEINS AQP8 CFTR IN THE LINING OF THE COLON OF RATS AFTER ANTIBIOTIC THERAPY

*Antibiotic therapy ceftriaxone cephalosporin III generation causes a disturbance in the transport of water and electrolytes through the epithelium of the colon. In our study found that 5- and 14-daily administration of ceftriaxone causes changes in the level of CFTR protein and AQP8 in colon mucosa of rats that may underlie the molecular mechanisms of antibiotic-associated diarrhea.*

*Keywords: colon, ceftriaxone diarrhea.*

УДК 612.8; 612.82/.83

Л. Купа, студ., Н. Філімонова, канд. фіз.-мат. наук, І. Зима, канд. біол. наук  
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ

### СТАТЕВІ ВІДМІННОСТІ В АКТИВНОСТІ ГОЛОВНОГО МОЗКУ ЛЮДИНИ ПРИ ВИЗНАЧЕННІ ВЕРБАЛЬНОГО ІНТЕЛЕКТУ

*У дослідженні в якості обстежуваних добровільно взяли участь 40 осіб, серед яких 20 чоловіків та 20 жінок, правші, віком 18-23 роки, студенти I-IV курсів КНУ імені Тараса Шевченка. В результаті проведеного дослідження було виявлено, що завдання на визначення вербального інтелекту (субтести "Логічний Відбір", "Загальні Риси", "Аналогії" та "Класифікації" тесту структури інтелекту Амтхауера) у чоловіків вирішувались в рамках єдиної нейромережі. При цьому, порівняно з жінками, у них, в більшій мірі, була задіяна права півкуля, тобто залучались образні сприйняття та обробка вербальної інформації, а також, здійснюється більш селективний відбір інформації та вибір мети. У жінок, порівняно з чоловіками, в субтестах "Аналогії" та "Класифікації" у більшій ступені обробка інформації здійснювалась в локальних нейромережах задньої асоціативної зони неокортексу.*

*Ключові слова: тест структури інтелекту Амтхауера, вербальний інтелект, ЕЕГ.*

**Вступ.** Перед будь-яким керівником або менеджером з персоналу рано чи пізно постає задача оцінки співробітників. На сьогоднішній день різноманітні психологічні тести та тести оцінки рівня інтелектуальності є основними методами оцінки персоналу. Здібності виділяють загальні та спеціальні. Загальні, або сукупність загальних здібностей ще називають обдарованістю та зазвичай ототожнюють з інтелектом. Інтелект – це вроджена здібність до пізнання та ефективного рішення проблем, зокрема до пізнання нового кола життєвих задач. В основі інтелекту лежить моделювання відношень навколишнього середовища [1]. В якості тесту інтелекту використовують тести IQ, Векслера, Stanford-Binet Intelligence Test та ін., серед яких слід виділити тест структури інтелекту Амтхауера, що був розроблений у 1953 році, для діагностики загальних розумових здібностей, визначення структури інтелекту [2] та вимірювання інтелектуального розвитку у осіб у віці від 13 до 61 року [3]. Тест характеризується хорошими методичними показниками: коефіцієнт тестової надійності складає 0,83-0,91, коефіцієнт надійності частин тесту (за методом "розщеплення") – 0,97 [2], що дає можливість проводити дослідження окремих компонентів інтелекту відповідними субтестами. Тест складається з 9 субтестів по 16-20 завдань в кожному, 4 з яких направлені на дослідження вербального інтелекту, а саме: субтест №1 "Логічний Відбір" (ЛВ), що досліджує індуктивне мислення, відчуття обстежуваним мови, субтест №2 "Загальні Риси" (ЗР), який досліджує здатність до абстрагування, оперування вербальними

поняттями, субтест №3 "Аналогії" (А) – визначає комбіаторні здібності та субтест №4 "Класифікації" (К), що оцінює здатність приймати рішення. Аналіз механізмів сприйняття і обробки вербальної інформації та вивчення статевих відмінностей у цих процесах є дуже важливим для прогнозування успішної професійної діяльності в сферах, в яких необхідні спеціальні інтелектуальні здібності в роботі з текстами, а саме – в сфері освіти, бізнесу, силових структурах та ін.

Оскільки аналіз ЕЕГ при певних когнітивних навантаженнях дає можливість отримати кількісні оцінки активності відповідних зон кори головного мозку, що залучені до виконання цих завдань, метою роботи було дослідити статеві відмінності у реалізації вербального інтелекту. Завданням роботи було дослідити зміни активності головного мозку чоловіків та жінок під час тестування субтестів ЛВ, ЗР, А та К тесту структури інтелекту Амтхауера.

**Матеріали та методи.** У дослідженні добровільно взяли участь 40 осіб (20 чоловіків та 20 жінок), правші, віком від 18-23 років, студенти I-IV курсів КНУ імені Тараса Шевченка. Кожен з обстежуваних проходив 4 комп'ютерні субтести: ЛВ, ЗР, А та К. В субтесті ЛВ задачею обстежуваного було вибрати слово, яке завершить певне речення. Було запропоновано 20 завдань, які необхідно виконати не більше, ніж за 6 хв. В субтесту ЗР в кожному з 20 завдань обстежуваному було запропоновано п'ять слів, чотири з яких поєднані певним змістовим зв'язком, а п'яте слово – зайве, що і необхідно виділити серед інших. В субтесту А в кожному завданні обстежуваному