

десять раз (13,5 і 27 мг/кг відповідно) приводить до зменшення кількості тромбоцитів в крові ( $p=0.012$ ;  $p=0.027$  відповідно) без змін кількості мегакариоцитів в кістковому мозку в порівнянні з контролем. Аналіз морфофункціонального стану мегакариоцитів при впливі MI-1 в 10-кратній дозі свідчить про збільшення незрілих промегакариоцитів, гіпо- і мікромегакариоцитів на фоні зменшення зрілих поліхроматофільних і оксифільних мегакариоцитів, а також гігантських і гіперсегментованих клітин. Виявлені зміни мегакариоцитопоза при впливі MI-1 в 10-кратній дозі свідчать про затримку диференціації мегакариоцитів, що і призводить до зменшення продукції тромбоцитів і, внаслідок їх концентрування в зонах порушення мікроциркуляції в різних тканинах, тромбоцитопенії в крові.

**Ключові слова:** похідне малеїміда, інгібітор протеїнази, мегакариоцити, тромбоцити.

I. Byelinska, Ph. D.,  
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

#### EFFECT OF MALEIMIDE DERIVATIVE PROTEIN KINASES INHIBITOR WITH ANTITUMOR ACTIVITY ON MEGAKARYOCYTOPOIESIS OF RATS

The effect of the inhibitor protein kinases maleimide derivative MI-1 (1-(4-Cl-benzyl)-3-Cl-4-(CF<sub>3</sub>-phenylamino)-1H-pyrrole-2,5-dione) with antitumor activity at doses at five times (13.5 mg/kg) and ten times (27 mg/kg) the effective dose for subacute exposure on morphofunctional state of bone marrow megakaryocytes and platelet count in the blood of rats have been studied. MI-1 at the dose of 2.7 mg/kg (effective antitumor – decreases the number of colon tumors and the affected area of the colon of rats) during 14 days does not change the count of platelets in the blood and megakaryocytes, which form platelets, in the bone marrow compared to the untreated control group. Increasing the dose of MI-1 to 5- and 10-times (13.5 and 27 mg / kg, respectively) leads to a decrease in the number of platelets in the blood ( $p=0.012$ ;  $p=0.027$ , respectively) without changes in the number of megakaryocytes in the bone marrow compared to the untreated control. Analysis of the morphofunctional state of megakaryocytes at the 10-fold increased dose of MI-1 indicates an increase in immature promegakaryocytes, hyposegmented and micromegakaryocytes to reduce background mature polychromatophilic and oxyphilic megakaryocytes and hypersegmented and giant cells. Megakaryocytopoiesis revealed changes under the influence of MI-1 in 10-times the effective dose testify delay differentiation of megakaryocytes, which causes a decrease platelet production and, including their concentration in the altered areas of microcirculation in various tissues, leading to thrombocytopenia in the blood of rats.

**Key words:** maleimide derivative, protein kinases inhibitor, megakaryocytes, platelets.

УДК 577.21:612.34:616.33-008.821.14

А. Драницина, канд. біол. наук, К. Дворченко, д-р біол. наук,  
Д. Гребіник, канд. біол. наук, Л. Остапченко, д-р біол. наук  
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ

#### ЕКСПРЕСІЯ ГЕНА *AQP8* В ЕПІТЕЛІОЦИТАХ ДВАНАДЦЯТИПАЛОЇ КИШКИ ЩУРІВ ПРИ ДІАРЕЇ ЗА УМОВ ТРИВАЛОЇ ШЛУНКОВОЇ ГІПОХЛОРИДРІЇ

Показано зниження рівня експресії гена *Aqp8* в епітеліоцитах ворсинок і крипт дванадцятипалої кишки на тлі інтенсифікації процесів утворення вільних радикалів при діарейі за гіпоацидних умов. При введенні мультипробіотика Симбітер за тих самих умов рівень експресії проаналізованого гена в епітеліоцитах ворсинок і крипт наближався до контрольних значень.

**Ключові слова:** шлункова гіпохлоридрія, дванадцятипала кишка, діарея, експресія гена, *Aqp8*, мультипробіотик.

**Вступ.** Гіпоацидність шлункового соку має багатофакторну етіологію: вона супроводжує ряд захворювань (атрофічний гастрит, рак шлунка, аутоімунні порушення) і є результатом прийому фармакологічних препаратів – інгібіторів протонної помпи паріетальних клітин шлунка, поширеними представниками яких є омепразол, пантопразол тощо [1, 2]. Будучи достатньо безпечними, вони, тим не менш, здатні призводити до підвищення рівня гастрину в крові – гіпергастринемії [3]. Крім цього, розвиток дисбіозу – один із ключових наслідків тривалої гіпоацидності, при якому спостерігається колонізація шлунково-кишкового тракту (ШКТ) умовно-патогенною мікрофлорою, яка викликає тривалу ендogenous інтоксикацію, діарею і є додатковим чинником, який, окрім гіпергастринемії, сприяє шлунковому канцерогенезу, а також виникненню спорадичних пухлин в інших ділянках ШКТ, зокрема у дванадцятипалій кишці (ДПК) [4, 5].

Накопичення прозапальних молекул із джерела ендogenous запалення і вплив клітинних та секреторних компонентів дисбіотичної мікрофлори можуть призводити до розвитку запального процесу, наслідком чого є як потужна генерація активних форм кисню (АФК), так і ініціація окисного стресу (ОС) [6-7].

Поглинання води є однією з ключових функцій кишечника. Регулювання трансепітеліального транспорту рідини в ШКТ залежить від активності й кількості переносників, таких як: водні канали (пори) – аквапорини (AQP), принаймні – 11 ізоформ), електрогенний трансмембранний регуляторний білок CFTR, електронейтральний натрій-водневий транспортер 3 (NHE3), електрогенний натрієвий канал – ENaC тощо [8-12].

Аквапорини складають сімейство невеликих інтегральних мембранних білків великої родини основних внутрішніх білків (MIP), що селективно проникають до води і діють за осмотичними градієнтами [11, 13]. Аквапорин 8, який кодується геном *Aqp8*, знаходиться в епітеліальних клітинах тонкої та товстої кишок, а також в апікальній мембрані колоноподібних поглинаючих епітеліоцитів ворсинок і крипт ДПК щурів [14-16].

Показано залучення AQP, зокрема зміну експресії *Aqp8* у клітинах кишечника при захворюваннях, що супроводжуються порушеннями в транспорті води: при нецукровому діабеті, виразковому коліті, запальній хворобі кишечника (IBD), хворобі Крона, діарейі, зумовленій харчовою алергією, карциногенезі тощо, як у людини, так і в тварин [11, 13, 16].

Для корекції структурно-функціональних порушень у ШКТ використовують пробіотичні препарати, які виконують важливу роль у підтриманні загального гомеостазу організму за рахунок оптимізації його мікроекологічного статусу [17, 18]. Препарати групи "Симбітер® ацидофільний" концентрований (далі Симбітер) є максимально наближеною до природних мікробіоценозів організму людини та тварин концентрованою біомасою живих клітин мультикомпонентного симбіозу пробіотичних бактерій (*Bifidobacterium bifidum*, *B. longum*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. delbrueckii*, *L. helveticus*, *Propionibacterium freudenreichii*, *P. acidipropionici*, *Lactococcus lactis*, *Acetobacter acetii*, *Streptococcus salivarius*) [17, 18].

На сьогодні мало що відомо про можливу роль аномалій у транспорті електролітів та води в патогенезі діарейі, пов'язаної з дисбіотичними змінами внаслідок дії

тривалої гіпохлоргідрії. Тому метою роботи було проаналізувати експресію гена *Aqp8* в епітеліоцитах ДПК щурів за довготривалої пригнічення кислотоутворення в шлунок та при введенні мультипробіотичного препарату.

**Об'єкт та методи досліджень.** У дослідженні використовували білих нелінійних статевозрілих щурів-самців з масою 180-200 г, яких утримували на стандартному раціоні виварію. У роботі дотримувалися міжнародних рекомендацій для проведення медико-біологічних досліджень із використанням тварин відповідно до "Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для наукових експериментів або в інших наукових цілях".

Тварин розділяли на чотири групи. У контрольній (першій) групі використовували щурів, яким протягом 28 днів вводили інтраперитонеально 0,2 мл та перорально 0,5 мл води для ін'єкцій. Тварини другої групи протягом 28 днів перорально отримували Симбітер (виробництва ТОВ "О.Д. Пролісок") у дозі 0,14 мл/кг, розчинений у 0,5 мл води для ін'єкцій. Моделювання гіпоацидного стану (третя група) проводили за допомогою внутрішньочеревного введення 14 мг/кг омепразолу 1 раз на добу протягом 28 днів [19]. Четверта група щурів одночасно з інтраперитонеальним введенням омепразолу перорально отримувала Симбітер у вищезазначеній дозі. Кількість тварин у кожній експериментальній групі – 8-10.

Вміст нітрит-іонів визначали методом Грісса з модифікаціями за [20]. Вміст загального білка визначали за методом Лоурі [21]. Епітеліоцити ворсинок та крипт із ДПК ізолювали за допомогою низькотемпературного методу [22].

РНК отримували за методом Chomczynski [23]; Синтез кДНК та кількісну полімеразну ланцюгову реакцію в реальному часі (Real-time PCR, кПЛР) за допомогою комерційного набору "Thermo Scientific Verso SYBR Green 1-Step qRT-PCR ROX Mix" ("Thermo Scientific", Литва), використовуючи по 0,4 мкмоль/л кожного праймера, проводили за таких, рекомендованих фірмою-виробником, температурних умов: синтез кДНК 50°C – 30 хв; ініціююча денатурація 95°C – 15 хв; далі 40 циклів: денатурація ДНК 95°C – 15 с; гібридизація прайме-

рів 50°C – 35 с; добування ланцюга 72°C – 30 с.; елонгація ампліфікатів 72°C – 5 хв.

У реакціях було використано такі послідовності праймерів: для *Aqp8* (код відповідної мРНК – NM\_019158.2) – прямий – CAGATATGTCTGGGGAGCAGACGC та зворотний – CTGCCAGCAGTTCTTACCTCGAC; для *Actb* (NM\_031144.3, ген β-актину, що використовується в якості внутрішнього контролю реакції завдяки конститутивній експресії) – прямий – TGGGACGATATGGAGAAGAT та зворотний – ATTGCCGATAGTGATGACCT.

Відтворюваність результатів ампліфікації було перевірено в паралельних експериментах шляхом повторення кПЛР на зразках РНК усіх тварин, із кожним праймером не менше трьох разів. Після кожного циклу ампліфікації зчитувалась флуоресценція барвника SYBR Green I, а по закінченні реакції будувалась крива плавлення для контролю утворення димерів праймерів та специфічності реакції. Початкову кількість мРНК обраховували за порівняльним  $C_T$  методом "ΔΔC<sub>T</sub> Method", ефективність ПЛР реакції була однаковою ( $E_x = (10^{-1/slope}) - 1$ , slope < 0,1 [20]). Відносну кількість мРНК зазначених генів нормалізували до мРНК *Actb*.

Статистичну обробку результатів досліджень проводили на комп'ютері з використанням програмного пакету GraphPad Prism 5.04 (GraphPad Software Inc., США). Отримані дані тестували на нормальне розподілення за допомогою тесту Шапіро-Вілка. Подальший обрахунок результатів відбувався за допомогою двофакторного дисперсійного аналізу (two-way ANOVA) із пост тестом Бонферонні. Отримані результати наведені у вигляді середнього арифметичного ± середньоквадратичне відхилення (дисперсія) – SD, n = 7 – 10. Результати вважали значущими, коли p ≤ 0,05.

#### Результати та їх обговорення.

З'ясовано, що за умов тривалої шлункової гіпохлоргідрії в епітеліальних клітинах ДПК вміст органічних нітрит-іонів зростає: в епітеліоцитах ворсинок – у 2 рази (p ≤ 0,0001), в епітеліоцитах крипт – в 1,7 рази (p ≤ 0,0001) відносно контролю (Таблиця 1).

Таблиця 1. Вміст нітрит-іонів в епітеліоцитах дванадцятипалої кишки щурів за умов тривалої гіпохлоргідрії (M ± SD, n = 10)

Група тварин	Епітеліоцити	нмоль Ч мг білка <sup>-1</sup>
Контроль	ворсинки	2,23 ± 0,221 <sup>чч</sup>
	крипти	1,74 ± 0,193 <sup>чч</sup>
Симбітер	ворсинки	1,86 ± 0,201 <sup>чччч</sup>
	крипти	1,35 ± 0,123 <sup>чччч</sup>
Омепразол	ворсинки	4,52 ± 0,463 <sup>****чччч</sup>
	крипти	2,93 ± 0,281 <sup>****чччч</sup>
Омепразол + Симбітер	ворсинки	2,55 ± 0,274 <sup>####чч</sup>
	крипти	2,11 ± 0,232 <sup>*###чч</sup>

Примітки: \*\*\*\*, \*\*, \* – p ≤ 0,0001, p ≤ 0,01, p ≤ 0,05 відносно контролю; ####, ###, – p ≤ 0,0001, p ≤ 0,001 відносно тварин, яким вводили лише омепразол; чччч, ччч, чч, ч – p ≤ 0,0001, p ≤ 0,001, p ≤ 0,01, p ≤ 0,05 ворсинки порівняно з криптами.

Монооксид нітрогену (NO) – найменша з відомих на сьогодні сигнальних молекул, що продукується майже виключно ензиматичним шляхом – під дією спеціалізованих NO-синтаз (NOS) [24]. Нітрит-іони є стабільним продуктом, що відображає рівень NO в тканинах. Нині вважається, що основним джерелом базального рівня NO в ДПК є конститутивні ізоформи NOS з ендотелію судин та нервів, а також низький рівень експресії індукцибельної NOS, що кодується геном *Nos2* [25]. Проте збільшення вмісту NO в клітинах ДПК може викликати нітрування та нітрозилування білків та ДНК, що може призвести до функціонального та структурного пошко-

дження органа [24]. Крім того, враховуючи раніше показане нами зростання вмісту  $\cdot O_2^-$  [26], можна зробити припущення про генерацію пероксинітриту (ONOO<sup>-</sup>) за таких умов, оскільки він є продуктом взаємодії супероксидного аніону та NO. Завдяки своїм властивостям пероксинітрит здатний викликати пошкодження широкого спектру молекул: окиснювати NH- і SH-групи білків, індукувати процеси ліпопероксидації у мембранах та викликати одноланцюгові розриви ДНК [24].

Отже, збільшення вмісту нітрит-іонів може свідчити про розвиток запалення в ДПК, яке супроводжується посиленням процесів утворення вільних радикалів [6, 7, 24].

При сумісному введенні мультипробіотика Симбітер шурам із гіпоацидним станом зазначений показник знижувався в 1,8 раза в епітеліоцитах ворсинок ( $p \leq 0,0001$ ) і в 1,4 раза в криптах ( $p \leq 0,001$ ) відносно групи тварин, яким вводили омепразол. Проте лишився підвищеним в 1,3 раза ( $p \leq 0,05$ ) в епітеліоцитах крипт відносно контролю. Це свідчить про зменшення запальних процесів у ДПК за рахунок протимікробної та антиоксидантної дії мультипробіотика Симбітер [6, 7, 17, 18]. Таким чином, на першому етапі дослідження показано інтенсифікацію прооксидантного фактора в клітинах ДПК за гіпоацидних умов і показано його пригнічення за умов введення мультипробіотика.

Дослідження характеру експресії гена *Aqp8* показало, що рівні його експресії в контрольній та другій групі

епітеліоцитів крипт значуще не відрізнялися, так само як і у ворсинках. За умов тривалого пригнічення кислотопродуруючої функції шлунка шурів цей показник знижувався: у 2 рази в епітеліоцитах ворсинок ( $p \leq 0,0001$ ) і в 2,5 рази в криптах ( $p \leq 0,0001$ ) відносно контролю. Рівень мРНК гена *Snn1b* в епітелії ворсинок ДПК шурів, які разом з омепразолом отримували мультипробіотик, повертався до контрольних значень порівняно з тваринами третьої групи ( $p \leq 0,0001$ ). За аналогічних умов зазначений показник у криптах зростав в 1,9 раза ( $p \leq 0,0001$ ) по відношенню до показників групи з гіпоацидним станом шлунка та лишився зменшеним в 1,3 раза ( $p \leq 0,05$ ) відносно контролю (рис. 1.).

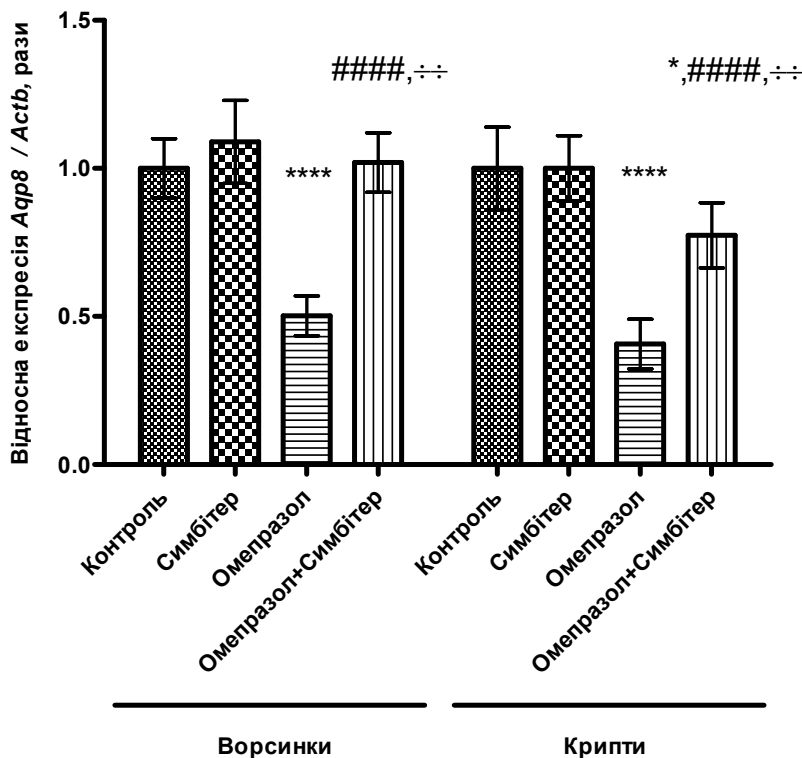


Рис. 1. Рівень експресії мРНК гена *Aqp8* у різних типах епітеліальних клітин дванадцятипалої кишки шурів за умов тривалої гіпоацидності та при введенні мультипробіотика.

\*\*\*\* –  $p \leq 0,0001$ , \* –  $p \leq 0,05$  відносно контролю; #### –  $p \leq 0,0001$  відносно тварин, яким вводили лише омепразол; чч –  $p \leq 0,01$  ворсинки порівняно з криптами

ШКТ здатний секретувати велику кількість води, а транспітеліальна гіперсекреція рідини є основою секреторною діареї. Однак дефекти в поглинанні води в кишечнику, як і порушення механізмів абсорбції іонів (в основному,  $Na^+$ ,  $H^+$ ,  $Cl^-$ ) є характерними ознаками запалення в слизовій кишечника й призводять до діареї [4, 8, 9, 13]. Супутні механізми останньої можуть поєднувати активування секреції, зменшення поглинання та дефекти бар'єрної функції епітелію [11, 13]. Як і при запальній хворобі кишечника, діарея, є доволі розповсюдженим проявом гіпохлоргідрії шлунка [4].

Хоча CFTR відіграє вирішальну роль у регуляції електролітного гомеостазу, не так багато відомо про експресію його гена в слизовій оболонці кишечника при запаленні. Відомо, що гіперекспресія *Cftr* може призвести як до підвищеної секреції іонів хлору, так і до зниження поглинання іонів натрію в слизовій оболонці, що, у кінцевому рахунку, сприятиме діареї, наприклад, при

дії бактеріальних ентеротоксинів [8]. Раніше нами було показано [12] вірогідне зростання експресії *Slc9a3* (гена, що кодує натрій-водневий транспортер 3 – NHE3) за умов тривалої шлункової гіпохлоргідрії і за підвищеної експресії *Cftr*, що може свідчити про порушення в поглинанні  $Na^+$  ворсинками та криптами епітелію саме ДПК, і можна співставити з роботами, де продемонстровано *Cftr*-індуковану експресію мРНК гена *Slc9a3* в епітелії тонкого й товстого кишечника [8, 27]. Окрім цього, у попередніх дослідженнях ми виявили вірогідне зменшення експресії гена *Snn1b* (гена, що кодує натрієвий канал – ENaC) за умов тривалої шлункової гіпохлоргідрії й на тлі підвищеної експресії *Cftr*, що може свідчити про зниження реабсорбції іонів натрію в епітеліоцитах ДПК [12].

Нами було виявлено зниження експресії гена аквапорину 8 – *Aqp8* при раніше встановленому зменшенні експресії *Snn1b* та зростанні *Cftr* і *Slc9a3*, що свідчить

про поєднання дефектів як у поглинанні води у ДПК, так і в механізмах абсорбції іонів при діарейі внаслідок тривалої шлункової гіпоацидності [12]. Так, наприклад, зменшення рівня експресії *Aqp8* корелювало з погіршенням симптомів діарейі, зокрема при хворобі Крона та виразковому коліті [11, 13].

Таким чином, зміни в експресії *Aqp8* в епітеліоцитах дванадцятипалої кишки шурів можуть також відігравати важливу роль наряду із CFTR у патогенезі діарейі, асоційованої із запаленням, шляхом змін функцій та властивостей  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  – каналів,  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  – транспортеру SLC26A3, NHE3, ENaC, змін у секреції слизу й поглинанні води [8, 9, 11, 13, 27].

У той же час у деяких дослідженнях на різних моделях запального процесу отримано неоднозначні результати й запропоновано, що так як порушення у всмоктуванні  $\text{Na}^+$  і  $\text{Cl}^-$  асоційовані зі зменшенням різниці електричних потенціалів та активності  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФ-ази клітини, функціонування якої є також необхідною для апікальної секреції  $\text{Cl}^-$  [27], можна припустити, що аномалії в поглинанні іонів натрію та хлору більшою мірою, ніж у секреції іонів хлору, є первинними, а порушення в поглинанні води – вторинними в патогенезі діарейі [8, 9, 27].

Отже, встановлені зміни експресії гена *Aqp8* в епітеліоцитах ворсинок та крипт за умов тривалої шлункової гіпоацидності свідчать про розвиток патологічних процесів у тканині ДПК, зокрема запалення та діарейі [11] внаслідок зменшення поглинання води на доданок до показаних нами раніше – збільшенні трансепітеліальної секреції іонів хлору та пригніченні епітеліального всмоктування NaCl. При цьому продемонстровано ключову роль саме дисбіозу травного тракту в ініціації пошкодження епітеліоцитів, наприклад, за рахунок деградації тучних клітин – мастоцитів, як було продемонстровано в колоноцитах при запальній хворобі кишечника, хворобі Крона [28]. Адже мастоцити є проміжною ланкою між запальними клітинами, їх медіаторами та нервовою системою в нервово-гуморальній регуляції ШКТ. Під час активації мастоцитів, наприклад, прозапальними молекулами з джерела ендогенного запалення і/або клітинними та секреторними компонентами дисбіотичної мікрофлори вивільняються різноманітні медіатори, у тому числі гістамін, простагландин D2, лейкотрієн C4, фактор активації тромбоцитів, гепарин та нейтральні протеази. [28, 29]. Крім цього, було виявлено зміни в транспорті іонів після активування мастоцитів, що призводило до розвитку запалення та сенсомоторної дисфункції кишечника [30].

Також нами визначено, що до біохімічних механізмів ушкодження ДПК за умов тривалої шлункової гіпоацидності залучається інтенсифікація прооксидантного фактору, що посилюється за цих умов, та зміни в експресії генів *Aqp8*, *Cftr*, *Snn1b*, *Slc9a3* у відповідь на патогенну мікрофлору. Нормалізація експресії проаналізованих генів при застосуванні мультипробіотичного препарату також свідчить про істотний внесок дисбіотичних порушень у патологічні процеси, що відбуваються в епітеліоцитах ДПК за умов тривалої гіпохлоридрії. Стосовно можливих механізмів впливу мультипробіотика Симбітер на експресію генів у ДПК, перш за все, слід зазначити його здатність елімінувати бактеріальну колонізацію ШКТ та дисбіоз [7, 17, 18]. Ефективність дії досліджуваного препарату пов'язана з широким спектром його біологічної активності та високим рівнем безпечності для організму. Адже продукти життєдіяльності бактеріальних штамів, представлених в препараті Симбітер: коротколанцюгові жирні кислоти, вітаміни, імуномодулятори тощо володіють антиоксидантними властивостями, завдяки чому вони здатні гальмувати розвиток ОС та

знижувати інтенсивність запальних і деструктивних процесів у ШКТ й асоційованих органах [6, 7, 17-19].

**Висновки.** Показано, що тривале експериментальне пригнічення кислотної секреції шлунка супроводжується зміною експресії гена *Aqp8* в епітеліоцитах ДПК шурів. При введенні мультипробіотика Симбітер за тих самих умов рівень експресії цього гена в епітеліоцитах ворсинок і крипт наближався до контрольних значень. Отримані дані можуть свідчити про залучення аквапорину до головних медіаторів транспорту електролітів у патогенезі діарейі при розвитку запального процесу у ДПК, обумовленого дисбіотичними змінами за умов тривалої гіпохлоридрії.

#### Список використаних джерел

1. *Molecular mechanisms in therapy of acid-related diseases* / J. Shin, O. Vagin, K. Munson et al. // *Cell and molecular life sciences* 2008. – Vol. 65, N 2. – P. 264-281. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
2. *Acid-suppressing drugs and gastroesophageal reflux disease as risk factors for acute pancreatitis – results from a Swedish Case-Control Study* / A. Sundstrom, K. Blomgren, L. Alfredson et al. // *Pharmacoepidemiology and drug safety*, 2006. – Vol. 15, N 3. – P.141-149. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
3. *Johnson D. A. Reported side effects and complications of long-term proton pump inhibitor use* / D. A. Johnson, E. C. Oldfield I.V. // *Clinical gastroenterology and hepatology*, 2013. – Vol. 11 – P.458-464. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
4. *Physiology of the gastrointestinal tract*. 4th edition / K. Barrett, F. Ghishan, J. Merchant et al. – N. Y. : Academic Press, 2006. – 2080 p. Available from: <http://www.sciencedirect.com>
5. *Safety of long-term use of proton pump inhibitors* / A. Thomson, M. Sauve, N. Kassam et al. // *World journal of gastroenterology*, 2010. – Vol. 16, N 19. – P. 2323-2330. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
6. *Probiotics enhance pancreatic glutathione biosynthesis and reduce oxidative stress in experimental acute pancreatitis* / F. Lutgendorff, L. M. Trulsson, L. P. van Minnen et al. // *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 2008. – Vol. 295, N 5. – P. 1111–1121. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
7. *Вплив окисного стресу на рівень експресії генів TGF- $\beta$  і HGF у печінці шурів в умовах тривалої шлункової гіпохлоридрії та за введення мультипробіотика Симбітер* / К. О. Дворченко, О. О. Берник, А. С. Драничина та ін // *Укр. біохім. журн.*, 2013. – Т. 85, №5. – С. 114–123.
8. *Upregulation of CFTR expression but not SLC26A3 and SLC9A3 in ulcerative colitis* / H. Lohi, S. Mäkelä, K. Pulkkinen et al. // *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.*, 2002. – Vol. 283 – P. G567–G575. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
9. *Kunzelmann K. Electrolyte transport in the mammalian colon: mechanisms and implications for disease* / K. Kunzelmann, M. Mall. // *Physiol Rev.*, 2002. – Vol. 82 – P. 245–289. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
10. *Intestinal inhibition of the  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger 3 prevents cardiorenal damage in rats and inhibits  $\text{Na}^+$  uptake in humans* / A. G. Spencer, E.D. Labonte, D. P. Rosenbaum et al. // *Sci. Transl. Med.*, 2014. – Vol. 6, N 227. – P. 227-36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
11. *Zhu Cui. Expression, distribution and role of aquaporin water channels in human and animal stomach and intestines* / Cui Zhan, Zhuang Chen, Zongyong Jiang // *Int. J. Mol. Sci.*, 2016. – Vol. 17, № 9. – P. 1399. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
12. *Expression of *Cftr*, *Slc9a3* and *Snn1b* genes in rat duodenal epithelial cells upon long-term gastric hypochlorhydria and with administration of multiprobiotic* / A. Dranitsina, K. Dvorshchenko, D. Grebinyk, L. Ostapchenko. // *Bich. Київ. нац. ун-ту імені Тараса Шевченка. Біологія*, 2012; – №1 (71). – P. 8–13.
13. *5-Fluorouracil Induces Diarrhea with changes in the expression of inflammatory cytokines and aquaporins in mouse intestines* / H. Sakai, A. Sagara, K. Matsumoto et al. // *PLoS ONE*, 2013. – Vol. 8, № 1. – e54788. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
14. *Expression and immunolocalization of the aquaporin-8 water channel in rat gastrointestinal tract* / G. Calamita, A. Mazzone, A. Bizzoca et al. // *Eur J Cell Biol.*, 2001. – Vol. 80, № 11. – P. 711–719. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
15. *Immunolocalization of aquaporin-8 in rat kidney, gastrointestinal tract, testis, and airways* / M. Elkjær LENE, N. Nejsum, V. Gresz et al. // *Am J Physiol Renal Physiol.*, 2001. – Vol. 281. – F1047–F1057. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
16. *Aquaporin 3 and 8 are down-regulated in TNBS-induced rat colitis* / G. Zhao, J. Li, J. Wang et al. // *Biochem Biophys Res Commun.*, 2014. – Vol. 443, № 1. – P. 161–166. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
17. *Culligan E. Probiotics and gastrointestinal disease: successes, problems and future prospects* / E. Culligan, C. Hill, R. Sleator // *Gut pathogens*, 2009. – Vol. 1, N 19. – P. 38-49. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
18. *Iankovsky D. Microbiota and human health* / D. Iankovsky, G. Dyment. – Kyiv : LLC Chervona Ruta-Turs, 2008.

19. Tsyriuk O. I. Effect of omeprazole-induced hypergastrinemia on the basal gastric secretion in rats / O.I. Tsyriuk, T.V. Beregova // Bulletin of biological and medical issues, 2007. – N 3. – P.38-43. Available from: <http://www.irbis-nbuv.gov.ua>

20. Analysis of nitrate, nitrite and [<sup>15</sup>N] nitrate in biological fluids / L.C. Green, A.W. David, J. Glogowski et al. // Anal. Biochem., 1982. – Vol. 126, № 1. – P. 131–138. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

21. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr et al. // The journal of biological chemistry, 1951. – 193, N 1. – P. 265–275. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

22. Flint N. A low-temperature method for the isolation of small-intestinal epithelium along the crypt-villus axis / N. Flint, F. L. Cove, G. S. H. Evans // Biochemical journal, 1991. – Vol. 280 (Pt 2). – P.331–334. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

23. Chomczynski P. Single-step method of RNA isolation by acid guanidiniumthiocyanate-phenol-chloroform extraction / P. Chomczynski, N. Sacchi // Analytical biochemistry, 1987. – Vol. 162. – P. 156-159. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

24. Calcerrada P. Nitric oxide-derived oxidants with a focus on peroxynitrite: monelcular targets, cellular responses and therapeutic implications / P. Calcerrada, G. Peluffo, R. Radi // Curr. Pharm. Des., 2011. – Vol. 17, № 35. – P. 3905–3932. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

25. Cho C.H. Current roles of nitric oxide in gastrointestinal disorders / C.H. Cho // J. Physiol Paris., 2001. – Vol. 95, № 1-6. – P. 253-256. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

26. Дворщенко К.О. Вплив мультипробиотику Симбітер на вільнорадикальні процеси в епітеліоцитах дванадцятипалої кишки за умов тривалої шлункової гіпохлоргідрії / К.О. Дворщенко, У.А. Савко, Л.І. Остапченко // Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія, 2013. – № 1. – P. 85-92.

27. Jakab R. L. Physiological relevance of cell-specific distribution patterns of CFTR, NKCC1, NBCe1, and NHE3 along the crypt-villus axis in the intestine / R. L. Jakab, A. M. Collaco, N. A. Ameen // Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol., 2011. – Vol. 300, N 1. – P. G82-98. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

28. Activated mast cells in proximity to colonic nerves correlate with abdominal pain in irritable bowel syndrome / G. Barbara, V. Stanghellini, R. De Giorgio et al. // Gastroenterol., 2004. – Vol. 126, № 3. – P. 693–702. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

29. Vagal influences over mast cells / R.H. Stead, E.C. Colley, B. Wang et al. // Auton. Neurosci., 2006. – Vol. 125, № 1-2. – P. 53–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

30. Intestinal mast cells in gut inflammation and motility disturbances / Y. Benedicte, De Winter, M. Rene et al. // Biochimica et Biophysica Acta. – 2012; – Vol. 1822. – P. 66–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

## References

- Shin J, Vagin O, Munson K, Kidd M, Modlin IM, Sachs G. Molecular mechanisms in therapy of acid-related diseases. Cell Mol Life Sci. 2008;65(2):264-81. PubMed Central PMCID: PMC3081136.
- Sundstrom A, Blomgren K, Alfredsson L, Wiholm BE. Acid-suppressing drugs and gastroesophageal reflux disease as risk factors for acute pancreatitis – results from a Swedish Case-Control Study. Pharmacoeconomic Drug Saf. 2006;15(3):141-9. PubMed PMID: 16200654.
- Johnson D.A., Oldfield E.C. I.V. Reported side effects and complications of long-term proton pump inhibitor use. Clin Gastroenterol Hepatol. 2013;11:458-64. PubMed PMID: 23247326.
- Barrett K, Ghishan F, Merchant J, Said HM, Wood JD. Physiology of the gastrointestinal tract. 4th ed. New York: Academic Press; 2006. 2080 p.
- Thomson A, Sauve M, Kassam N, Kamitakahara H. Safety of long-term use of proton pump inhibitors World J Gastroenterol. 2010;16(19):2323-30. PubMed PMID: 20480516.
- Lutgendorff F, Trulsson LM, van Minnen LP, Rijkers GT, Timmerman HM, Franzén LE. Probiotics enhance pancreatic glutathione biosynthesis and reduce oxidative stress in experimental acute pancreatitis. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2008;295(5):G1111-21. PubMed PMID: 18832452.
- Dvorshchenko K, Berynk O, Dranitsina A, Senin S, Ostapchenko L. Vpliv oksidnog stresu na riven ekspesiji geniv TGF-β i HGF u pechini schuriv v umovah trivaloi shlunkovoi hipohlorhidrii ta za vvedennya multiprobiotika Symbiter. Ukr Biochem J. 2013;85(5):114-23. Ukrainian.
- Lohi H, Mäkelä S, Pulkkinen K, Huglund P, Karjalainen-Lindsberg ML, Puolakkainen P, et al. Upregulation of CFTR expression but not SLC26A3 and

SLC9A3 in ulcerative colitis. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2002;283(3):G567-75. PubMed PMID: 12181169.

9. Kunzelmann K, Mall M. Electrolyte transport in the mammalian colon: mechanisms and implications for disease. Physiol Rev. 2002;82:245–89. PubMed PMID: 11773614.

10. Spencer AG, Labonte ED, Rosenbaum DP, Plato CF, Carreras CW, Leadbetter MR, et al. Intestinal inhibition of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger 3 prevents cardiorenal damage in rats and inhibits Na<sup>+</sup> uptake in humans. Sci Transl Med. 2014;6(227):227-36. PubMed PMID: 24622516.

11. Cui Zhu, Zhuang Chen, Zongyong Jiang. Expression, distribution and role of aquaporin water channels in human and animal stomach and intestines. Int. J. Mol. Sci. 2016;17(9):13992. PMID: PMC5037679.

12. Dranitsina A, Dvorshchenko K, Grebinyk D, Ostapchenko L. Expression of *Cftr*, *Slc9a3* and *Snn1b* genes in rat duodenal epithelial cells upon long-term gastric hypochlorhydria and with administration of multiprobiotic. Bulletin of Taras Shevchenko National University of Kyiv. Biology. 2016;1(71):8-13.

13. Sakai H, Sagara A, Matsumoto K, Hasegawa S, Sato K, Nishizaki M, Shoji T, Horie S, Nakagawa T, Tokuyama S, Narita M. 5-Fluorouracil Induces Diarrhea with Changes in the Expression of Inflammatory Cytokines and Aquaporins in Mouse Intestines. PLoS ONE. 2013;8(1):e54788.

14. Calamita G, Mazzone A, Bizzoca A, Cavalier A, Cassano G, Thomas D, Svetlo M. Expression and immunolocalization of the aquaporin-8 water channel in rat gastrointestinal tract. Eur J Cell Biol. 2001;80(11):711-9. PMID: 11824790.

15. Elkjær M, Nejsum LN, Gresz V, Kwon Tae-Hwan, Jensen UB, Frøkjaer J, Nielsen S. Immunolocalization of aquaporin-8 in rat kidney, gastrointestinal tract, testis, and airways Am J Physiol Renal Physiol. 2001;281:F1047–F1057.

16. Zhao G, Li J, Wang J, Shen X, Sun J. Aquaporin 3 and 8 are down-regulated in TNBS-induced rat colitis. Biochem Biophys Res Commun. 2014;443(1):161-6. PMID: 24286754.

17. Culligan E, Hill C, Sleator R. Probiotics and gastrointestinal disease: successes, problems and future prospects. Gut Pathog. 2009;1(19):38-49. PubMed PMID: 19930635.

18. Iankovsky D. Microbiota and human health / D. Iankovsky, G. Dymant. – Kyiv : LLC Chervona Ruta-Turs, 2008. – 552 p.

19. Tsyriuk OI, Beregova TV. Vpliv omeprazole-vyklikanoi uipergastrinemii na shkunkovu sekreciyu u schuriv. Visnik problem biologii i medicine. 2007;3:38-43. Ukrainian.

20. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite and [<sup>15</sup>N] nitrate in biological fluids. Anal. Biochem. 1982;126(1):131–8. PMID: 7181105.

21. Lowry OH, Rosebrough NJ., Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem. 1951;193(1):265-75. PubMed PMID: 14907713.

22. Flint N, Cove FL, Evans GS. A low-temperature method for the isolation of small-intestinal epithelium along the crypt-villus axis. Biochem J. 1991;280(Pt 2):331-4. PubMed PMID: 1747105.

23. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidiniumthiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem. 1987;162(1):156-9. PubMed PMID: 2440339.

24. Calcerrada P, Peluffo G, R. Radi. Nitric oxide-derived oxidants with a focus on peroxynitrite: monelcular targets, cellular responses and therapeutic implications. Curr. Pharm. Des. 2011;17(35):3905–3932.

25. Cho CH. Current roles of nitric oxide in gastrointestinal disorders. J Physiol Paris. 2001;95(1-6):253-6. PMID: 11595446.

26. Dvorshchenko K, Savko U, Ostapchenko L. Impact of multiprobiotic Symbiter on free radical processes in duodenal epitheliocytes in conditions of prolonged gastric hypacidity. Experimental and clinical physiology and biochemistry. 2013;1:85-92.

27. Jakab RL, Collaco AM, Ameen NA. Physiological relevance of cell-specific distribution patterns of CFTR, NKCC1, NBCe1, and NHE3 along the crypt-villus axis in the intestine. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2011;300(1):G82-98. PubMed PMID: 21030607.

28. Barbara G, Stanghellini V, De Giorgio R, Cremon C, Cottrell GS, Santini D, Pasquinelli G, Morselli-Labate AM, Grady EF, Bunnett NW, Collins SM, Corinaldesi R. Activated mast cells in proximity to colonic nerves correlate with abdominal pain in irritable bowel syndrome. Gastroenterol. 2004;126(3):693–702. PMID: 14988823.

29. Stead RH1, Colley EC, Wang B, Partosoedarso E, Lin J, Stanisz A, Hillsley K. Vagal influences over mast cells, Auton. Neurosci. 2006;125(1-2):53-61. PMID: 16500155.

30. Benedicte Y, De Winter, Rene M. van den Wijngaard, Wouter J. de Jonge. Intestinal mast cells in gut inflammation and motility disturbances. Biochimica et Biophysica Acta. 2012;1822:66–73.

Надійшла до редколегії 02.03.17

А. Драничина, канд. биол. наук, Е. Дворщенко, д-р биол. наук, Д. Гребиньк, канд. биол. наук, Л. Остапченко, д-р биол. наук  
Киевский национальный университет им. Тараса Шевченко, Киев

## ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА *AQP8* В ЭПИТЕЛИОЦИТАХ ДВЕНАДЦАТИПЕРСТНОЙ КИШКИ КРЫС ПРИ ДИАРЕЕ В УСЛОВИЯХ ДЛИТЕЛЬНОЙ ЖЕЛУДОЧНОЙ ГИПОХЛОРИДРИИ

Показано уменьшение уровня экспрессии гена *Aqp8* в эпителиоцитах ворсинок и крипт двенадцатиперстной кишки крыс на фоне интенсификации процессов образования свободных радикалов при диарее в гипоацидных условиях. При введении мультипробиотику Симбитер в тех же условиях уровень экспрессии данного гена в эпителиоцитах ворсинок и крипт приближался к контрольным значениям.

Ключевые слова: желудочная гипохлоридрия, двенадцатиперстная кишка, диарея, экспрессия гена, *Aqp8*, мультипробиотик.

A. Dranitsina, Ph. D., K. Dvorshchenko, D. Sci., D. Grebinyk, Ph. D., L. Ostapchenko, D. Sci.  
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv

### EXPRESSION OF AQP8 GENE IN RAT DUODENAL WITH DIARRHEA UPON LONG-TERM GASTRIC HYPOCHLORHYDRIA

The decreasing of Aqp8 gene's expression in rat duodenal villus and crypt epithelial cells against the background of intensification of free radical formation with diarrhea upon gastric hypoacidic conditions were shown. The level of above mentioned gene's expression both in villus and crypt epitheliocytes approached to the control value upon the treatment of hypoacidic rats with multiprobiotic Symbiter.

Key words: gastric hypoacidity, duodenal, diarrhea, gene expression, Aqp8, multiprobiotic.

УДК 577.126:577.121.6:577.2.04.

М. Лилик, асп., О. Сорочинська, асп., О. Манюх, асп., М. Байляк, канд. біол. наук  
Державний Вищий Навчальний Заклад "Прикарпатський національний університет  
імені Василя Стефаника", Івано-Франківськ, Україна

### ВІКОВІ ФІЗІОЛОГО-БІОХІМІЧНІ ЗМІНИ *DROSOPHILA* ПРИ УТРИМАННІ НА СЕРЕДОВИЩІ З АЛЬФА-КЕТОГЛУТАРАТОМ

Досліджено деякі метаболічні показники та показники функціонального старіння у самців плодової мушки *D. melanogaster*  $w^{1118}$  при вирощуванні на середовищі з альфа-кетоглутаратом (АКГ). Харчовий АКГ підвищував вміст амінокислот та білка у 2-денних самців та триацилгліцеридів у 24-денних самців без впливу на антиоксидантну систему самців обох вікових груп. Також АКГ підвищував стійкість до теплового стресу в обох вікових групах, не впливав на стійкість до оксидантів і запобігав зниженню рухової активності самців старшого віку.

Ключові слова: амінокислоти, триацилгліцериди, тепловий стрес, локомоторна активність.

**Вступ.** Альфа-кетоглутарат (АКГ) є проміжним метаболітом циклу Кребса та реакцій амінування/трансамінування амінокислот. На даний час вивчається вплив АКГ як харчової добавки, яка проявляє багатосторонні позитивні ефекти на організм. На ссавцях показано, що додавання солей альфа-кетоглутарової кислоти до їжі стимулює обмінні процеси та відновлення організму при ушкодженнях шлунково-кишкового тракту, травмах м'язів та кісток [12; 26]. Встановлено, що стимулювання синтезу білка при станах білкового дефіциту зумовлене тим, що АКГ є джерелом для біосинтезу таких амінокислот, як пролін, глутамат, глутамін та аспартат [12; 17]. Окрім того, виявлена здатність АКГ стимулювати мітохондріальне дихання та окисне фосфорилування у печінці білих щурів [16]. У здорових людей з віком концентрація АКГ в плазмі крові суттєво знижується і при цьому уповільнюються процеси біосинтезу білка, тому було запропоновано розглядати АКГ як потенційно анти-віковий фактор [12; 22]. На сьогодні наявні лише окремі дослідження з використання харчового АКГ для запобігання зниження функціональної активності та метаболічних процесів з віком. Так, виявлено, що харчовий АКГ здатен підтримувати редокс-гомеостаз та модулювати антиоксидантний захист у старих мишей [22]. Показана здатність екзогенного АКГ збільшувати тривалість життя нематоди *Caenorhabditis elegans* за механізмом подібним до механізму калорійного обмеження [8].

У наших попередніх дослідженнях було знайдено, що вирощування плодової мушки *Drosophila melanogaster* на середовищі, яке містило АКГ, порізно впливало на амінокислотний обмін у молодих особин лінії Canton S [20]. З використанням іншої лінії мушок –  $w^{1118}$ , нами було показано, що харчовий АКГ викликає різні метаболічні зміни у молодих та середньо-вікових особин *D. melanogaster*, які відображаються на стійкості до стресів та плодючості. Так, вирощування на АКГ призводило до підвищення вмісту білка, зниження вмісту триацилгліцеридів та індукції оксидативного стресу у молодих самок  $w^{1118}$ , а в самок старшого віку АКГ спричиняв протилежні зміни [4]. У вказаному дослідженні були використані лише самки. Враховуючи, що раніше нами були виявлені метаболічні відмінності у молодих самців та самок плодової мушки лінії

Canton S за вирощування на АКГ [20], у даній роботі ми прагнули з'ясувати, чи будуть спостерігатися відмінності у впливі харчового АКГ на метаболізм самців *D. melanogaster*  $w^{1118}$  молодого та старшого віку. Також ми дослідили, чи тривале споживання їжі, збагаченої АКГ, може сповільнювати функціональне старіння самців  $w^{1118}$ . Як показники функціонального старіння були оцінені стійкість до низки стресорів та індукована рухова активність самців [10; 11].

**Метою даної роботи** було дослідити фізіолого-біохімічні особливості молодих (2-денних) та середньо-вікових (24-денних) самців *D. melanogaster* лінії  $w^{1118}$  за культивування на АКГ.

**Матеріали і методи.** У роботі використовували лінію  $w^{1118}$  *D. melanogaster*, отриману з Блюмінтонського Стокового Центру університету Індіани (США). Особливістю лінії є наявність білих очей через мутацію у гені white. Батьківську культуру мух утримували на дріжджово-м'ясному середовищі [20]. Експериментальні культури мух вирощували на середовищі, яке містило 5 % сухих пекарських дріжджів, 5 % сахарози, 1 % агару та 0,18 % ніпагіну (для інгібування росту цвілевих грибів). У дослідні середовища додатково вносили 10 мМ розчин натрієвої солі АКГ (кінцева концентрація) [20]. Культивування проводили при 25 °С, постійній вологості (50-60 %) та світловому режимі день:ніч – 16:8. Після вилуплення мух розділяли за статтю шляхом анестезування за допомогою вуглекислого газу. У подальших експериментах використовували лише самців, яких або переводили на свіжі середовища того самого складу для отримання 24-денних особин, або використовували для біохімічних та фізіологічних тестів. Заміну середовищ проводили кожного другого дня.

Визначення індукованої рухової активності базувалось на явищі негативного геотаксису у мух [10]. Для цього по 10 самців вносили у скляні пробірки, струшували їх на дно та фіксували кількість особин, які долали відстань 5 см догори за 20 с. У кожному з чотирьох незалежних повторів протестовано по 40 мух. Стійкість до теплового стресу визначали за часом впадання мух у теплову кому при 39, 40 та 41 °С. У кожному з трьох незалежних повторів було тестовано по 10–12 самців. Для визначення стійкості до голодування по 10 самців вносили у скляні пробірки, які містили 1,25 мл 1 % агару