

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ *Tlr2*, *Defa*, *Muc2* В ЭПИТЕЛИОЦИТАХ ДВЕНАДЦАТИПЕРСТНОЙ КИШКИ КРЫС ПРИ ДЛИТЕЛЬНОЙ ГИПОАЦИДНОСТИ ЖЕЛУДКА И ЕЕ МУЛЬТИПРОБИОТИЧЕСКОЙ КОРРЕКЦИИ

А.С. ДРАНИЦИНА, Е.А. ДВОРЩЕНКО, А.А. МОРГАЕНКО, Л.И. ОСТАПЧЕНКО

Институт биологии Киевского национального университета имени Тараса Шевченко
E-mail: alevtina.dranitsina@gmail.com

*Исследована экспрессия генов *Tlr2*, *Defa*, *Muc2* в эпителиоцитах двенадцатиперстной кишки (ДПК) крыс при длительной гипоацидности (гипохлоргидрии) желудка и при ее мультипробиотической коррекции. Показано увеличение уровня экспрессии генов *Tlr2*, *Muc2*, *Defa* на фоне интенсификации процессов перекисидации липидов в эпителиоцитах ворсинок и крипт ДПК крыс в гипоацидных условиях. При введении мультипробиотика в тех же условиях паттерн экспрессии исследованных генов в эпителиоцитах ворсинок и крипт снижался или приближался к контрольным значениям, как и содержание продуктов перекисного окисления липидов. Полученные данные могут свидетельствовать об участии генов *Tlr2*, *Muc2*, *Defa* в развитии воспалительного процесса в ДПК, обусловленного дисбиотическими изменениями при длительной гипохлоргидрии.*

Ключевые слова: экспрессия генов *Tlr2*, *Muc2*, *Defa*, желудочная гипоацидность, двенадцатиперстная кишка, мультипробиотик.

Введение. Реализация изменений генной экспрессии в клетках в результате повреждающего воздействия требует определенного времени и является следствием длительного действия раздражителя. Кроме того, оценка характера экспрессии генов позволяет расширить представления о механизмах, происходящих в клетке при тех или иных патологических состояниях [1–3].

В последние годы среди населения разных стран все большее распространение получают гастроэнтерологические заболевания, среди которых доминирует группа болезней, классифицирующихся как кислотозависимые: пептическая язва, синдром Золлингера-Эллисона и т.д. Наиболее эффективными фармакологическими средствами при лечении таких заболеваний остаются ингибиторы протонной помпы (ИПП) париетальных клеток желудка, рас-

пространенным представителем которых является омепразол [4, 5]. Развитие дисбиоза — одно из ключевых последствий длительной гипоацидности, при которой наблюдается колонизация желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) условно-патогенной микрофлорой. Это сопровождается продолжительной эндогенной интоксикацией и является дополнительным фактором, который, кроме гипергастринемии, способствует желудочному канцерогенезу и возникновению спорадических опухолей в других участках ЖКТ, в частности двенадцатиперстной кишке (ДПК) [6, 7].

Накопление провоспалительных молекул из эндогенного источника и влияние клеточных и секреторных компонентов дисбиотической микрофлоры могут приводить к развитию воспалительного процесса, следствием чего является мощная генерация активных форм кислорода (АФК) и инициация окислительного стресса (ОС), в том числе активация перекисного окисления липидов (ПОЛ). ОС непосредственно влияет на молекулярные механизмы регуляторных процессов в клетке, включая экспрессию генов [3, 8].

Ген *Tlr2* (кодирует Toll-like рецептор 2) экспрессируется в энтероцитах, колоноцитах, клетках неспецифического иммунитета (макрофаги, мастоциты и т.п.). Продукт гена — TLR2 — играет ключевую роль в распознавании компонентов клеточной стенки грамположительных бактерий, содержащихся в пристеночном слое кишечника, и поддержании толерантности к собственной микрофлоре [9, 10]. Описано повышение содержания TLR2 в результате дисбиотических изменений в условиях развития энтеропатий, воспалительного заболевания кишечника (IBD), болезни Крона, язвенного колита и т.д. как у человека, так и у животных [9, 11–13].

Ген *Muc2* кодирует муцин 2 (MUC2, MUC-2/Intestinal mucin-2) и в норме экспрессируется

в легких, тонком кишечнике, в частности, ворсинках, криптах, бокаловидных клетках и бруннеровых железах ДПК [14–16]. Обнаруженное повышение уровня MUC2 в толстом кишечнике под действием пробиотиков можно рассматривать как защитный механизм против транслокации патогенной микрофлоры через стенку кишечника [17]. В то же время отмечена гиперэкспрессия этого гена как при воспалении, так и при дуоденальной аденокарциноме [18].

Ген *Defa* кодирует белок – предшественник α -дефензина 5, одного из основных секреторных белков клеток Панета, которые локализируются в базальных отделах кишечных крипт. Основными мишенями действия α -дефензинов являются грамположительные и грамотрицательные бактерии [2]. В целом уровень α -дефензинов растет в ответ на бактериальную колонизацию кишечника [2]. У пациентов с болезнью Крона зарегистрировано снижение экспрессии α -дефензинов, в то время как при язвенном колите – повышение экспрессии [1, 2]. В условиях развития опухолей, происходящих из клеток Панета, наблюдается повышение в 60 раз экспрессии α -дефензинов 5 и 6 [19].

Для коррекции структурно-функциональных нарушений в ЖКТ применяют пробиотические препараты, играющие важную роль в поддержании общего гомеостаза организма за счет оптимизации его микробиологического статуса [20, 21].

При анализе научной литературы не было найдено данных о характере экспрессии генов *Tlr2*, *Defa*, *Muc2* в эпителиоцитах ДПК крыс при экспериментальной гипоацидности желудка. Кроме этого, остается неизученным действие пробиотических препаратов на экспрессию этих генов в двенадцатиперстной кишке при таких условиях.

Цель исследования – проанализировать экспрессию генов *Tlr2*, *Muc2*, *Defa* в эпителиоцитах ДПК крыс при длительном подавлении кислотообразования в желудке и при мультипробиотической коррекции гипоацидности желудка.

Материалы и методы. В исследовании использовали белых нелинейных половозрелых крыс-самцов массой 180–200 г, содержащихся на стандартном рационе вивария. В работе

с экспериментальными животными придерживались международных рекомендаций для проведения медико-биологических исследований в соответствии с «Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для научных экспериментов или в иных научных целях».

Животных разделили на четыре группы. В контрольной (первой) группе использовали крыс, которым в течение 28 сут вводили интраперитонеально 0,2 мл и перорально 0,5 мл воды для инъекций.

Животные второй группы в течение 28 сут перорально получали мультипробиотический препарат последнего поколения группы «Симбитер® ацидофильный» концентрированный (далее Симбитер) производства ООО «О.Д. Пролисок» в дозе 0,14 мл/кг, растворенный в 0,5 мл воды для инъекций. Симбитер является максимально приближенной к естественным микробиоценозам организма человека и животных концентрированной биомассой живых клеток мультикомпонентного симбиоза 16 штаммов видов пробиотических бактерий (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Propionibacterium*, *Acetobacter*) [21].

Моделирование гипоацидного состояния (третья группа) проводили с помощью внутрибрюшинного введения 14 мг/кг омепразола один раз в сутки в течение 28 сут [22]. Омепразол по структуре представляет собой замещенное производное бензимидазола. При достижении ним секреторных канальцев париетальных клеток желудка образуется активная форма молекулы – сульфенамид омепразола. Протонированная форма значительно хуже проникает через клеточные мембраны, за счет чего концентрация омепразола именно в секреторных канальцах париетальных клеток примерно в 1000 раз превышает его концентрацию в крови [4]. Сульфенамид омепразола действует как тиофильный агент, создавая дисульфидные мостики с 321, 813 и 822 остатками цистеина H^+/K^+ -АТФазы, что приводит к необратимому ингибированию фермента и снижению секреции протонов в просвет секреторных канальцев [4].

Четвертая группа крыс одновременно с интраперитонеальным введением омепразола перорально получала Симбитер в упомянутой до-

зе. Количество животных в каждой экспериментальной группе – 6.

Содержание диеновых конъюгатов определяли спектрофотометрическим [23], а шиффовых основ – флюорометрическим методами [24]. Содержание ТБК-активных продуктов определяли по реакции с тиобарбитуровой кислотой [25], содержание общего белка – по методу Лоури [26].

Эпителиоциты ворсинок и крипт с ДПК изолировали с помощью быстрого низкотемпературного метода (4 °С), суть которого состоит в промывании тонкого кишечника крыс при постоянном перемешивании и чередовании различных буферных растворов с последующим сбором фракций ворсинок и крипт [27].

РНК получали по методу Chomczynski [28]. Полимеразную цепную реакцию с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) осуществляли в 20 мкл реакционной смеси, которая содержала 2 мкг РНК, 1 мМ dNTP, 200 ед. обратной транскриптазы «Thermo Scientific RevertAid Reverse Transcriptase», соответствующий буферный раствор, 20 ед. рибонуклеазного ингибитора «Thermo Scientific RiboLock RNase Inhibitor» («Thermo Scientific», Литва), 1 мкМ обратный праймер. Синтез продолжался при следующих условиях: 65 °С – 5 мин, 45 °С – 1 ч. ПЦР проводили в 30 мкл реакционной смеси, содержащей 3 мкл кДНК, буферный раствор для ПЦР, по 200 мкМ каждого dNTP («Thermo Scientific»), по 1 мкМ каждого из праймеров, до 2,5 мМ MgCl₂ и 1 ед. *Taq* ДНК полимеразы («*Taq* DNA Polymerase (recombinant)», «Thermo Scientific»).

Аmplификацию фрагментов ДНК осуществляли при таких температурных условиях: начальная денатурация 95 °С – 3 мин; далее 35 циклов (для гена β-актина, используемого в качестве внутреннего контроля реакции, *Actb*, – 28 циклов, для *Defa* – 30 циклов): денатурация ДНК 95 °С – 1 мин; отжиг праймеров 45 °С – 45 с для *Tlr2* (456 п.н.), 50 °С – 45 с для *Muc2* (265 п.н.), 47 °С – 40 с для *Defa* (325 п.н.) и 49 °С – 40 с для *Actb* (521 п.н.); элонгация 72 °С – 1 мин 15 с или 1 мин (для *Defa* и *Actb*); финальная элонгация при 72 °С – 5 мин.

В реакциях использовали следующие последовательности праймеров:

для *Tlr2* – (NM_198769.2)*

F – GGAGGTCTCCAGGTCAAATCT,
R – TGATGTTTCCCCCAGTGTCC;

для *Muc2* (NM_023566.3)*

F – CAGAGTGCATCAGTGGCTGT,
R – CCCGTCGAAGGTGATGTAGT;

для *Defa* (NM_173329.2)*

F – AAAGATCTGAGACCCACAGCC,
R – TTCTTCTTGGTCGGAGTGTCT;

для *Actb* (NM_031144.3)*

F – TGGGACGATATGGAGAAGAT,
R – ATTGCCGATAGTGTATGACCT

Воспроизводимость результатов амплификации проверяли в параллельных экспериментах путем повторения ПЦР на кДНК всех животных, с каждым праймером не менее трех раз.

Разделение продуктов ПЦР проводили электрофоретически в 1,6 % агарозном геле («Agarose LE», «Roche», Германия), в 0,5-кратном ТВЕ-буферном растворе при напряженности электрического поля 5–10 В/см [29].

Для полуколичественного анализа экспрессии ампликонов на основе денситометрии использовали программу ImageJ 1.45s («NIH», США). Относительные уровни экспрессии генов определяли для каждого образца по Konturek et al. [30].

Статистическую обработку результатов исследований проводили на компьютере с использованием программного пакета GraphPad Prism 5.04 (GraphPad Software Inc., США). Полученные данные тестировали на нормальное распределение с помощью теста Шапиро-Уилка. Дальнейший расчет результатов происходил с помощью двухфакторного дисперсионного анализа (two-way ANOVA) с пост-тестом Бонферрони. Полученные результаты приведены в виде среднего арифметического ± среднее отклонение (дисперсия) – SD. Результаты считали достоверными, когда $p \leq 0,05$.

Результаты исследований и их обсуждение. Известно, что гипохлоргидрия сопровождается интенсификацией ПОЛ в различных тканях организма [3, 8]. Ранее нами показано, что введение омепразола крысам в течение 28 сут приводило к существенному повышению кон-

* Код соответствующей мРНК

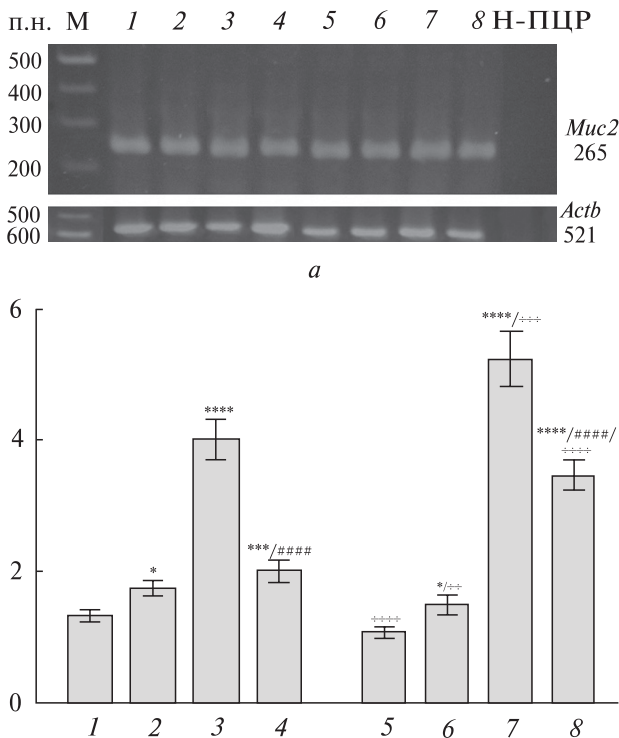


Рис. 1. Уровень экспрессии мРНК гена *Tlr2* в различных типах эпителиальных клеток двенадцатиперстной кишки крыс в условиях длительной гипоацидности и при введении мультипробиотика: *a* – ОТ-ПЦР электрофореграмма; *b* – гистограмма уровня экспрессии относительно *Actb* (по вертикали, усл. ед.); М – маркер молекулярной массы; эпителиоциты ворсинок: 1 – контроль; 2 – Симбитер; 3 – омепразол; 4 – омепразол + Симбитер; эпителиоциты крипт: 5 – контроль; 6 – Симбитер; 7 – омепразол; 8 – омепразол + Симбитер; Н-ПЦР – отрицательный контроль ПЦР; * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$ относительно контроля; #### $p \leq 0,0001$ относительно животных, которым вводили только омепразол; ++++ $p \leq 0,0001$, +++ $p \leq 0,001$, ++ $p \leq 0,01$ ворсинки по сравнению с криптами

центрации первичных, вторичных и конечных продуктов ПОЛ в клетках ДПК: в эпителиоцитах ворсинок – в 1,7 ($p \leq 0,001$), 1,6 ($p \leq 0,001$), 1,5 ($p \leq 0,001$) раза, в криптах – в 2,1 ($p \leq 0,001$), 2,3 ($p \leq 0,001$), 1,8 ($p \leq 0,001$) раза соответственно по сравнению с контрольными значениями [31]. У крыс, которые вместе с омепразолом получали мультипробиотик (четвертая группа), показатели приближались к контрольным значениям, в то время как у животных, получавших Симбитер (вторая группа),

содержание продуктов ПОЛ преимущественно было ниже контроля [31]. Таким образом, на первом этапе исследования выявлена активация липидной пероксидации в клетках ДПК при гипоацидных условиях и показано ослабление процессов ПОЛ в условиях введения мультипробиотика на фоне экспериментальной гипохлоргидрии [31].

В результате проведенных нами экспериментальных исследований обнаружена экспрессия мРНК гена *Tlr2* (продукт ОТ-ПЦР размером 456 п.н.) в образцах эпителиоцитов ворсинок и крипт ДПК как контрольной, так и второй группы животных, получавших мультипробиотик (рис. 1).

Уровни экспрессии гена *Tlr2* в контрольной и второй группе эпителиоцитов крипт так же, как и в ворсинках, достоверно не отличались. Уровни экспрессии этого гена в третьей и четвертой группах ворсинок и крипт ДПК достоверно отличались, как и между типами эпителиоцитов ($p \leq 0,0001$) (рис. 1).

Уровень экспрессии гена *Tlr2* в эпителиальных клетках ворсинок и крипт ДПК крыс в контроле составлял соответственно $0,092 \pm 0,0098$ и $0,101 \pm 0,0087$ относительно *Actb* (рис. 1). В условиях длительного подавления кислотопродуцирующей функции желудка крыс этот показатель был выше: в эпителиоцитах ворсинок – в 3,2 раза ($p \leq 0,0001$), в эпителиоцитах крипт – в 2,6 раза ($p \leq 0,0001$) относительно контроля.

Показано, что уровень мРНК гена *Tlr2* в эпителии ворсинок ДПК крыс, которые вместе с омепразолом получали мультипробиотик, был в 5 и 1,6 раза ниже ($p \leq 0,0001$), чем у животных третьей и контрольной групп соответственно. При аналогичных условиях этот показатель в клетках эпителия крипт снизился в 1,6 раза ($p \leq 0,0001$) относительно значения группы с гипоацидным состоянием желудка и увеличился в 1,7 раза ($p \leq 0,0001$) в сравнении с контролем.

TLR – давнее и эволюционно консервативное семейство рецепторов, которые играют важную роль во врожденном иммунитете и воспалительных процессах [32]. TLR распознают консервативные патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (PAMPs), свойственные большой группе микроорганизмов, и привлече-

ны к индукции врожденного и приобретенного иммунного ответа [32, 33]. В то же время энтероциты могут не отвечать на действие TLR-агонистов. В норме клетки кишечника синтезируют TLR3 и TLR5, а также на низком уровне TLR2 и TLR4. Недостаточность TLR2 и TLR4 является возможной причиной нечувствительности клеток кишечника к комменсальным бактериям. Кроме того, в этих клетках синтезируется в большом количестве TOLLIP, который ингибирует TLR2- и TLR4-пути, тем самым защищая от хронического воспалительного ответа на присутствие комменсальных бактерий [9].

Таким образом, обнаруженное повышение уровня экспрессии гена *Tlr2* в эпителиальных клетках ворсинок и крипт ДПК крыс в условиях длительной гипоацидности желудка свидетельствует о бактериальной колонизации ДПК.

Нами также показана экспрессия мРНК гена *Muc2* (продукт ОТ-ПЦР размером 265 п.н.) в образцах эпителиоцитов ворсинок и крипт ДПК контрольной и второй групп животных (рис. 2).

Уровни экспрессии гена *Muc2* в контрольной, второй, третьей и четвертой группах как ворсинок, так и крипт эпителия ДПК, достоверно отличались, как и между типами эпителиальных клеток (рис. 2). Уровень экспрессии гена *Muc2* в эпителиальных клетках ворсинок и крипт ДПК крыс в контроле составлял соответственно $1,33 \pm 0,085$ и $1,07 \pm 0,091$ относительно *Actb* (рис. 2). У крыс, которые получали мультипробиотик, уровень экспрессии *Muc2* был выше: в эпителиоцитах ворсинок – в 1,3 раза ($p \leq 0,05$), в эпителиоцитах крипт – в 1,4 раза ($p \leq 0,05$) по сравнению с контролем.

В условиях длительной гипохлоргидрии желудка этот показатель был выше: в эпителиоцитах ворсинок – в 3 раза ($p \leq 0,0001$), в эпителиоцитах крипт – в 4,9 раза ($p \leq 0,0001$) относительно контроля.

В то же время при одновременном введении с омепразолом мультипробиотика уровень мРНК в эпителии ворсинок ДПК крыс был в 2 раза ниже ($p \leq 0,0001$) и 1,5 раза выше ($p \leq 0,001$), чем у животных третьей и контрольной групп соответственно. При тех же условиях этот показатель в клетках эпителия крипт снизился в 1,5 раза ($p \leq 0,0001$) по отношению к показателям третьей группы и увели-

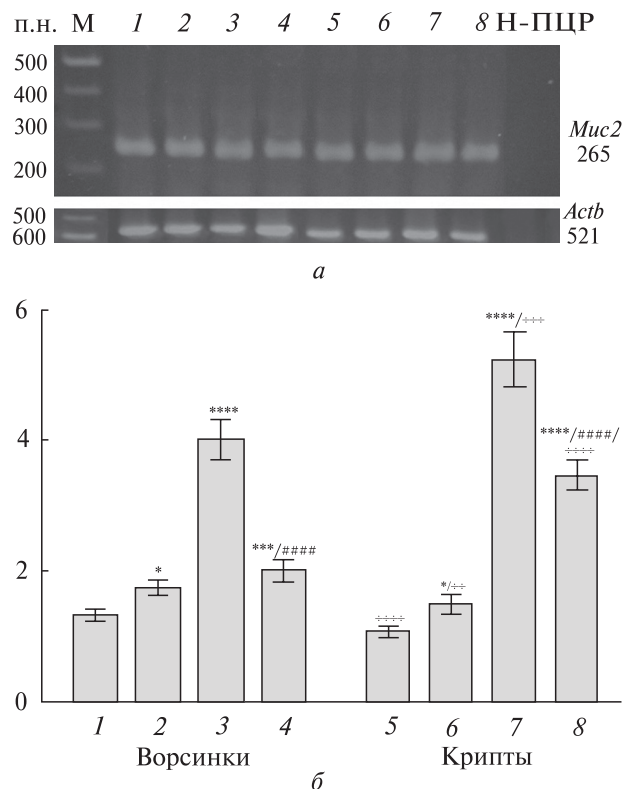


Рис. 2. Уровень экспрессии мРНК гена *Muc2* в различных типах эпителиальных клеток двенадцатиперстной кишки крыс в условиях длительной гипоацидности и при введении мультипробиотика. Обозначения см. рис. 1

чился в 3,3 раза относительно контроля ($p \leq 0,0001$).

Муцины покрывают слизистые оболочки гелем, обеспечивая защитную, смазывающую, барьерную и бактериостатическую функции. Нормальный уровень экспрессии муцинов является одним из защитных факторов против колонизации кишечника патогенами [16]. Индукция синтеза MUC2 происходит при бактериальной колонизации пищеварительной системы [15]. Повышение уровня MUC2 в кишечнике под действием пробиотиков может противодействовать транслокации патогенной микрофлоры через стенку кишечника [17]. Таким образом, выявленное нами повышение уровня экспрессии гена *Muc2* в эпителиоцитах ворсинок и крипт ДПК крыс в условиях длительной гипохлоргидрии желудка также свидетельствует о бактериальной колонизации ДПК.

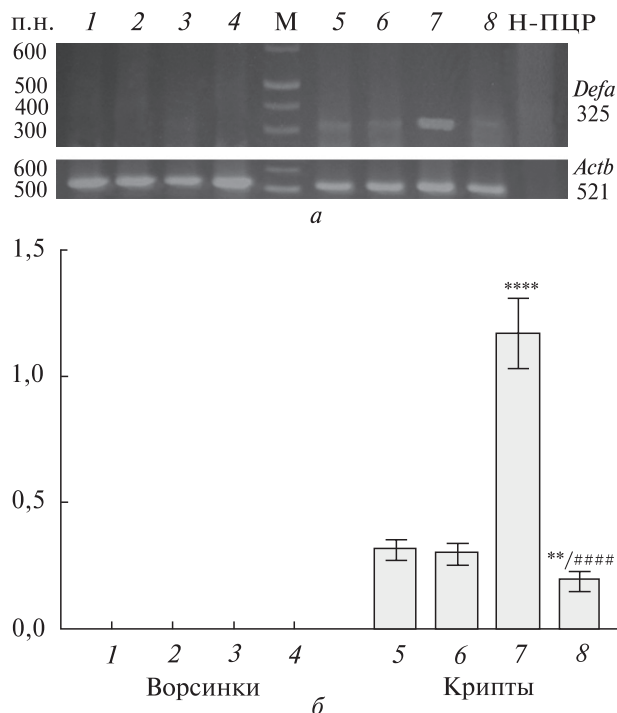


Рис. 3. Уровень экспрессии мРНК гена *Defa* в различных типах эпителиальных клеток двенадцатиперстной кишки крыс в условиях длительной гипоацидности и при введении мультипробиотика. Обозначения см. рис. 1

Нами установлено отсутствие мРНК гена *Defa* в эпителиальных клетках ворсинок ДПК во всех группах экспериментальных животных.

В контроле эпителиоцитов крипт уровень мРНК *Defa* гена составлял $0,315 \pm 0,0397$ относительно *Actb* (рис. 3). Уровни экспрессии гена в контрольной и второй группе крипт достоверно не отличались. У животных, которым вводили только омепразол, этот показатель был в 3,7 раза выше ($p \leq 0,0001$) по сравнению с контролем в эпителии крипт ДПК. Если же длительное подавление кислотной секреции желудка сопровождалось приемом мультипробиотика, то уровень мРНК гена *Defa* эпителиальных клеток крипт был в 1,7 раза ниже ($p \leq 0,01$), чем у животных контрольной группы, и в 6,1 раза снижался ($p \leq 0,0001$) относительно показателя крыс третьей группы.

Данные литературы свидетельствуют об изменении экспрессии генов α -дефензинов при

различных патологических состояниях: у пациентов с болезнью Крона зарегистрировано снижение уровня их экспрессии, сопровождавшееся неспособностью к инициации воспаления в стенке кишки; однако выявлено повышение уровня экспрессии генов α -дефензинов при язвенном колите [1, 2]. Индукцию экспрессии гена *Defa* в настоящее время связывают и с дисбиотическими процессами в ДПК, поскольку α -дефензины, являющиеся основными секреторными белками клеток Панета, направлены на обезвреживание грамположительных и грамотрицательных бактерий [2]. Следовательно, обнаруженное нами повышение уровня экспрессии гена *Defa* в эпителиоцитах крипт ДПК крыс при длительной кислотосупрессии желудка свидетельствует о бактериальной колонизации ДПК в таких экспериментальных условиях.

Длительная гипоацидность желудка приводит к бактериальной колонизации ДПК и развитию дисбиоза. В этих условиях происходит активация Toll-like рецепторов на поверхности эпителиальных клеток, повышение синтеза муцина 2 и секреция α -дефензинов клетками Панета в криптах ДПК, что согласуется с обнаруженным нами повышением экспрессии генов *Tlr2*, *Muc2*, *Defa*, следствием чего является развитие воспалительного процесса [1, 2, 9, 11–13, 15–19]. При этом происходит высвобождение провоспалительных цитокинов в клетках ДПК, в частности интерлейкинов (ИЛ-2, ИЛ-8), фактора некроза опухолей α (TNF α), фактора активации тромбоцитов (PAF) и т.п. на фоне снижения противовоспалительного ИЛ-10 [33]. Упомянутые цитокины индуцируют синтез молекул клеточной адгезии (МКА) на плазматической мембране нейтрофилов и эндотелиоцитов, что приводит к миграции нейтрофилов с микроциркуляторного русла в ткани ДПК [6]. Активация нейтрофилов обуславливает дальнейшее увеличение выработки провоспалительных цитокинов, рост синтеза МКА, повышение проницаемости сосудов и генерации АФК в эпителиоцитах ДПК. Высвобождение цитокинов и рост синтеза МКА способствуют еще большей миграции нейтрофилов, что в свою очередь обуславливает цикл воспаления, следствием чего становится усиленная генерация АФК, развитие ОС и увели-

чение экспрессии ряда генов, вовлеченных в развитие воспаления [3, 6, 33].

Итак, установленные изменения экспрессии генов *Tlr2*, *Muc2*, *Defa* в эпителиоцитах ворсинок и крипт в условиях длительной желудочной гипоацидности свидетельствуют о развитии патологических процессов в ткани ДПК, в частности воспаления. При этом продемонстрирована ключевая роль именно дисбиоза пищеварительного тракта в инициации повреждения эпителиоцитов и определено, что в молекулярно-биологические механизмы повреждения ДПК при длительной желудочной гипоацидности вовлечены реакции липидной пероксидации, усиливающейся при исследуемых условиях, и экспрессия генов *Tlr2*, *Muc2*, *Defa*, уровень которой возрастает как ответ на патогенную микрофлору. Обнаруженные различные уровни экспрессии и изменений экспрессии проанализированных генов в эпителиальных клетках ворсинок и крипт обусловлены структурно-функциональными особенностями клеток ДПК, в частности наличием в составе крипт клонов низкодифференцированных пролиферативных клеток, обладающих меньшей устойчивостью к ОС по сравнению с высокодифференцированными ворсинками [6]. Кроме этого известно, что на ранних стадиях воспалительных заболеваний тонкой кишки, в частности ДПК, в первую очередь повреждаются эпителиоциты крипт за счет миграции нейтрофилов из сосудов в просвет крипт, а это приводит к формированию криптовых абсцессов [6].

Нормализация экспрессии генов *Tlr2*, *Muc2*, *Defa* при применении мультипробиотического препарата также свидетельствует о существенном вкладе дисбиотических нарушений в патологические процессы, происходящие в эпителиоцитах ДПК при длительной гипохлоридрии. Относительно возможных механизмов воздействия мультипробиотика на экспрессию генов в ДПК прежде всего следует отметить его способность элиминировать бактериальную колонизацию ЖКТ и дисбиоз [20, 21, 34]. Эффективность его действия связана с широким спектром биологической активности, так как продукты жизнедеятельности бактериальных штаммов, представленных в препарате (витамины, аминокислоты, короткоцепочечные жирные кислоты, иммуномодуляторы и т.д.), обладают

антиоксидантными свойствами, благодаря чему они способны тормозить развитие ОС и снижать интенсивность воспалительных и деструктивных процессов в клетках ЖКТ [3, 20–22, 34].

Выводы. Показано, что длительное экспериментальное угнетение кислотной секреции желудка сопровождается изменением экспрессии генов *Tlr2*, *Muc2*, *Defa* на фоне интенсификации ПОЛ в эпителиоцитах ДПК крыс. При введении мультипробиотика при тех же условиях уровень экспрессии этих генов в эпителиоцитах ворсинок и крипт уменьшался или приближался к контрольным значениям, как и содержание продуктов ПОЛ. Полученные данные могут свидетельствовать об участии генов *Tlr2*, *Muc2*, *Defa* в развитии воспалительного процесса в ДПК, обусловленного дисбиотическими изменениями в условиях длительной гипохлоридрии.

EXPRESSION OF *Tlr2*, *Defa*, *Muc2* GENES IN RAT DUODENAL UPON LONG-TERM GASTRIC HYPACIDITY AND WITH MULTIPROBIOTIC CORRECTION

A.S. Dranitsina, K.O. Dvorshchenko, O.O. Morgaienko, L.I. Ostapchenko

Institute of Biology of Taras Shevchenko National University, Kyiv

Expression of *Tlr2*, *Muc2*, *Defa* genes in rat duodenal upon long-term gastric hypacidity (hypochlorhydria) and with multiprobiotic correction was investigated. Increasing of *Tlr2*, *Muc2*, *Defa* expression on the background of the intensification of lipid peroxidation in rat duodenal villus and crypt epithelial cells upon gastric hypoacidity was shown. The mRNAs patterns of genes mentioned above were shown to decrease or approach to control values as well as the level of lipid peroxidation products under the treatment of hypoacidic rats with the multiprobiotic. The data obtained may indicate involvement of genes *Tlr2*, *Muc2*, *Defa* in development of inflammation in the duodenum due to dysbiotic changes under conditions of prolonged hypochlorhydria.

ЕКСПРЕСІЯ ГЕНІВ *Tlr2*, *Defa*, *Muc2* В ЕПІТЕЛІОЦИТАХ ДВНАДЦЯТИПАЛОЇ КИШКИ ЩУРІВ ЗА УМОВ ТРИВАЛОЇ ГІПОАЦИДНОСТІ ШЛУНКА ТА ЇЇ МУЛЬТИПРОБІОТИЧНОЇ КОРЕКЦІЇ

A.C. Драницина, К.О. Дворщенко, О.О. Моргаєнко, Л.І. Остапченко

Досліджено експресію генів *Tlr2*, *Defa*, *Muc2* в епітеліоцитах дванадцятипалої кишки (ДПК) щурів за умов тривалої гіпоацидності (гіпохлоридрії) шлунка

та її мультипробіотичної корекції. Показано збільшення рівня експресії генів *Tlr2*, *Defa*, *Muc2* на тлі інтенсифікації процесів пероксидації ліпідів в епітеліоцитах ворсинок і крипт ДПК шурів у гіпоацидних умовах. При введенні мультипробіотика за тих же умов патерн експресії досліджених генів в епітеліоцитах ворсинок і крипт знижувався або наближався до контрольних значень, як і вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів. Отримані дані можуть свідчити про залучення генів *Tlr2*, *Muc2*, *Defa* в розвиток запального процесу в ДПК, обумовленого дисбіотичними змінами за умов тривалої гіпохлоргідрії.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Kobayashi, K.S., Chamaillard, M., Ogura, Y., Henegariu, O., Inohara, N., Nucez, G., and Flavell, R.A., Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract, *Science*, 2005, vol. 307, no. 5710, pp. 731–734.
2. Lisitsyn, N.A., Bukurova, Y.A., Nikitina, I.G., Krasnov, G.S., Sykulev, Y., and Beresten, S.F., Enteric alpha defensins in norm and pathology, *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.*, 2012, vol. 11, p. 1.
3. Dvorshchenko, K.O., Bernyk, O.O., Dranitsina, A.S., Senin, S.A., and Ostapchenko, L.I., Influence of oxidative stress on the level of genes expression *TGFB1* and *HGF* in rat liver upon long-term gastric hypochlorhydria and administration of multiprobiotic Symbiter, *Ukr. Biochem. J.*, 2013, vol. 85, no. 5, pp. 114–123 (in Ukrainian).
4. Shin, J.M., Vagin, O., Munson, K., Kidd, M., Modlin, I.M., and Sachs, G., Molecular mechanisms in therapy of acid-related diseases, *Cell Mol. Life Sci.*, 2008, vol. 65, no. 2, pp. 264–281.
5. Johnson, D.A., and Oldfield, E.C., Reported side effects and complications of long-term proton pump inhibitor use. Dissecting the evidence, *Clin. Gastroenterol. Hepatol.*, 2013, vol. 11, no. 5, pp. 458–464.
6. Johnson, L.R., Barrett, K.E., Gishan, F.K., Merchant, J.L., Said H.M., and Wood, J.D., *Physiology of the gastrointestinal tract*, 4th ed., New York, Acad. Press, 2006, 2080 p.
7. Thomson, A., Sauve, M., Kassam, N., and Kamitakahara, H., Safety of long-term use of proton pump inhibitors, *World J. Gastroenterol.*, 2010, vol. 16, no. 19, pp. 2323–2330.
8. Zhang, R., Brennan, M.L., Shen, Z., MacPherson, J.C., Schmitt, D., Molenda, C.E., and Hazen, S.L., Myeloperoxidase functions as a major enzymatic catalyst for initiation of lipid peroxidation at sites of inflammation, *J. Biol. Chem.*, 2002, vol. 277, no. 48, pp. 46116–46122.
9. Frolova, L., Drastich, P., Rossmann, P., Klimesova, K., and Tlaskalova-Hogenova, H., Expression of Toll-like receptor 2 (TLR2), TLR4, and CD14 in biopsy samples of patients with inflammatory bowel diseases: upregulated expression of TLR2 in terminal ileum of patients with ulcerative colitis, *J. Histochem. Cytochem.*, 2008, vol. 56, no. 3, pp. 267–274.
10. Erridge, C., Endogenous ligands of TLR2 and TLR4: agonists or assistants? *J. Leukoc. Biol.*, 2010, vol. 87, no. 6, pp. 989–999.
11. McMahon, L.A., House, A.K., Catchpole, B., Elson-Riggins, J., Riddle, A., Smith, K., Werling, D., Burgener, I.A., and Allenspach, K., Expression of Toll-like receptor 2 in duodenal biopsies from dogs with inflammatory bowel disease is associated with severity of disease, *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 2010, vol. 135, no. 1–2, pp. 158–163.
12. Burgener, I.A., König, A., Allenspach, K., Sauter, S.N., Boisclair, J., Doherr, M.G., and Jungi, T.W., Upregulation of Toll-like receptors in chronic enteropathies in dogs, *J. Vet. Intern. Med.*, 2008, vol. 22, no. 3, pp. 553–560.
13. Szebeni, B., Veres, G., Dezsöfi, A., Rusai, K., Vannay, Á., Mraz, M., Majorova, E., and Araty, A., Increased expression of Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in the colonic mucosa of children with inflammatory bowel disease, *Clin. Exp. Immunol.*, 2008, vol. 151, no. 1, pp. 34–41.
14. Kim, Y.S., and Ho, S.B., Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress, *Curr. Gastroenterol. Rep.*, 2010, vol. 12, no. 5, pp. 319–330.
15. Ikeda, H., Sasaki, M., Ishikawa, A., Sato, Y., Harada K., Zen, Y., Kazumori, H., and Nakanuma, Y., Interaction of Toll-like receptors with bacterial components induces expression of CDX2 and MUC2 in rat biliary epithelium in vivo and in culture, *Lab. Invest.*, 2007, vol. 87, no. 6, pp. 559–571.
16. McGuckin, M.A., Linden, S.K., Sutton, P., and Florin, T.H., Mucin dynamics and enteric pathogens, *Nat. Rev. Microbiol.*, 2011, vol. 9, no. 4, pp. 265–278.
17. Yu, J., Hao, X., Long, M., Wang, Q., Qu, Y., Wen, Y., Zhang, W., Luo, J., and Cao, H., Role of MUC2 gene in the regulation of rat intestinal barrier function by probiotics, *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*, 2013, vol. 33, no. 2, pp. 197–201.
18. Wang, T., Liang, Y.M., Hu, P., and Cheng, Y.F., Mucins differently expressed in various ampullary adenocarcinomas, *Diagn. Pathol.*, 2011, vol. 6, no. 102, pp. 1–8.
19. Joo, M., Shahsafaei, A., and Odze, R.D., Paneth cell differentiation in colonic epithelial neoplasms: evidence for the role of the Apc/beta-catenin/Tcf pathway, *Hum. Pathol.*, 2009, vol. 40, no. 6, pp. 872–880.
20. Culligan, E.P., Hill, C., and Sleator, R.D., Probio-

- tics and gastrointestinal disease: successes, problems and future prospects, *Gut. Pathog.*, 2009, vol. 1, no. 1, p. 19.
21. Iankovsky, D., and Dyment, G., Microbiota and human health, Kyiv: LLC Chervona Ruta-Turs, 2008, 552 p. (in Ukrainian).
 22. Tsyriuk, O.I., and Beregova, T.V., Effect of omeprazole-induced hypergastrinemia on the basal gastric secretion in rats, *Bull. Biol. Med.*, 2007, no. 3, pp. 38–43 (in Ukrainian).
 23. Gavrilov, V.B., Gavrilova, A.R., and Khmara, N.F., Measurement of conjugated diene in plasma by UV absorbance and heptane n-zopropyl-phenolic extracts, *Laboratory work*, 1988, no. 2, pp. 60–63 (in Russian).
 24. Kolesov, O.E., Markin, A.A., and Fedorova, T.N., Lipid peroxidation and methods for the determination of lipid peroxidation products in biological samples, *Laboratory work*, 1984, no. 9, pp. 540–546 (in Russian).
 25. Stalnaya, I.D., and Garishvili, T.G., Method for determination of malondialdehyde using thiobarbituric acid, *Modern methods in biochemistry*, Moscow, Medicine, 1977, pp. 66–68 (in Russian).
 26. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.I., Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, 1951, vol. 193, no. 1, pp. 265–275.
 27. Flint, N., Cove, F.L., and Evans, G.S., A low-temperature method for the isolation of small-intestinal epithelium along the crypt-villus axis, *Biochem. J.*, 1991, vol. 280 (Pt 2), pp. 331–334.
 28. Chomczynski, P., and Sacchi, N., Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction, *Anal. Biochem.*, 1987, vol. 162, no. 1, pp. 156–159.
 29. Green, M.R., and Sambrook, J., *Molecular cloning: A laboratory manual*, 4th ed., New York: Cold Spring Harbor Lab. Press, 2012, 2028 p.
 30. Konturek, P.C., Brzozowski, T., Walter, B., Burnat, G., Hess, T., Hahn, E.G., and Konturek, S.J., Ghrelin-induced gastroprotection against ischemia-reperfusion injury involves an activation of sensory afferent nerves and hyperemia mediated by nitric oxide, *Eur. J. Pharmacol.*, 2006, vol. 536, no. 1–2, pp. 171–181.
 31. Dvorshchenko, K.O., Savko, U.V., and Ostapchenko, L.I., Impact of multiprobiotic Cymbiter on free radical processes in duodenal epitheliocytes in conditions of long-term gastric hypochlorhydria, *Exp. Clini. Physiol. Biochem.*, 2013, vol. 1, no. 61, pp. 85–90 (in Ukrainian).
 32. Ghosh, C., and Bishayi, B., Characterization of Toll-Like receptor-4 (TLR-4) in the spleen and thymus of Swiss albino mice and its modulation in experimental endotoxemia, *J. Immunol. Res.*, 2015, vol. 2015, pp. 1–13.
 33. Lutgendorff, F., Trulsson, L.M., van Minnen, L.P., Rijkers, G.T., Timmerman, H.M., Franzén, L.E., Gooszen, H.G., Akkermans, L.M., Söderholm, J.D., and Sandström, P.A., Probiotics enhance pancreatic glutathione biosynthesis and reduce oxidative stress in experimental acute pancreatitis, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 2008, vol. 295, no. 5, pp. 1111–1121.

Поступила 04.02.15