

М. Горпинченко, асп., Л. Атраментова, д-р биол. наук
Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина, Харьков, Украина

ПОПУЛЯЦИОННО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАСЕЛЕНИЯ УКРАИНЫ, ПОЛУЧЕННЫЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ФАМИЛИЙ

Представлены результаты первого в Украине исследования структуры популяций разного иерархического уровня с использованием фамилий в качестве квазигенетических маркеров. Частоты фамилий, показатель случайной изонимии, случайная компонента инбридинга, индекс миграции, показатель разнообразия фамилий, показатель энтропии, показатель избыточности распределения фамилий рассчитаны как в целом для населения Украины, так и для отдельных регионов: восточного, южного, центрального, северного, западного, а также всех 25 областей страны. Результаты расчетов показали, что украинские фамилии являются надежным инструментом популяционно-генетических исследований, поскольку обладают достаточно высокой дифференцирующей способностью.

Ключевые слова: популяция, квазигенетический маркер, фамилии, изонимия, инбридинг.

M. Gorpynchenko, PhD student, L. Atramentova, DSc
V.N. Karazin Kharkiv National University, Kharkov, Ukraine

POPULATION GENETIC CHARACTERISTICS OF THE POPULATION OF UKRAINE OBTAINED WITH THE USE OF SURNAMES

The article presents the results of the first study in Ukraine of the population structure at different hierarchical levels inferred using surnames as quasigenetic markers. The surnames frequencies, random isonymy index, random component of inbreeding, migration index, rate of names diversity, index of entropy and index of redundancy of surnames diversity were calculated in total for the population of Ukraine, as well as for major geographic regions: Eastern, Southern, Central, Northern, Western and also for all the 25 administrative regions of the country. Our results show that Ukrainian surnames are a reliable tool for the population genetic studies, as they have a rather high differentiating ability.

Keywords: population, quasigenetic marker, surnames, isonymy, inbreeding.

УДК 577.21:612.34:616.33-008.821.14

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

ЭКСПРЕСИЯ ГЕНА *TLR2* В ЭПИТЕЛИОЦИТАХ ДВНАДЦАТИПАЛОЇ КИШКИ ЩУРІВ ЗА УМОВ ТРИВАЛОЇ ШЛУНКОВОЇ ГІПОХЛОРИДРІЇ ТА ПРИ ВВЕДЕННІ МУЛЬТИПРОБІОТИКА СИМБІТЕР

Показано зростання рівня експресії гена *Tlr2* в епітеліоцитах ворсинок та крипт дванадцятипалої кишки за гіпоацидних умов. При введенні мультипробіотика Симбітер за тих самих умов рівень експресії досліджуваного гена в епітеліоцитах ворсинок та крипт наближався до контрольних значень.

Ключові слова: шлункова гіпоацидність, дванадцятипала кишка, експресія гена *Tlr2*, мультипробіотик.

Вступ. Останніми роками все більшого поширення у населенні різних країн набувають гастроентерологічні захворювання, серед яких помітне місце належить групі захворювань, що класифікуються як кислотозалежні: пептична виразка, синдром Золлінгера-Еллісона тощо. Особливу увагу вчених, клініцистів привертають фармакологічні засоби, які здатні гальмувати секрецію хлоридної кислоти паріетальними клітинами шлунка. Сьогодні поширеним інгібітором протонної помпи (ІПП) є омепразол [1, 2]. Хоча безпечність ІПП є достатньо високою, їх тривалий прийом призводить до ряду побічних ефектів: порушення всмоктування вітамінів, підвищений ризик інфекцій, гіпергастринемії [3]. Крім цього, розвиток дисбіозу – один із ключових наслідків тривалої гіпоацидності, при якому спостерігається колонізація шлунково-кишкового тракту (ШКТ) умовно-патогенною мікрофлорою, що викликає тривалу ендogenous інтоксикацію та 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 потужна генерація активних форм кисню (АФК) та ініціація окисного стресу (ОС), зокрема активація перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) [6-7].

Ген *Tlr2* (кодує Toll-like рецептор 2) експресується в ентероцитах, колоноцитах, клітинах неспецифічного імунітету (макрофаги, мастоцити тощо). Продукт даного гена *TLR2* відіграє ключову роль у розпізнаванні компонентів клітинної стінки грам-позитивних бактерій, наяв-

них у пристінковому шарі кишечника, та підтриманні толерантності до власної мікрофлори [8-9]. Показано підвищення експресії *TLR2* внаслідок дисбіотичних змін за умов розвитку ентеропатій, запальної хвороби кишечника (IBD), хвороби Крона, виразкового коліту тощо, як у людини, так і в тварин [8, 10-12].

Для корекції структурно-функціональних порушень у ШКТ застосовують пробіотичні препарати, які виконують важливу роль у підтриманні загального гомеостазу організму за рахунок оптимізації його мікроекологічного статусу [13, 14]. Мультипробіотичні 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 (біфідобактерій, лактобактерій, молочнокислих стрептококів та пропіоновокислих бактерій) [13, 15].

При аналізі наукової літератури не було знайдено даних стосовно характеру експресії вищезазначеного гена в епітеліоцитах ДПК щурів за умов експериментальної гіпоацидності шлунка. Крім цього, лишається невисвітленою дія пробіотичних препаратів на експресію гена *Tlr2* в ДПК за таких умов.

Метою роботи було проаналізувати експресію гена *Tlr2* в епітеліоцитах ДПК щурів за довготривалого пригнічення кислотоутворення в шлунку (і, відповідно, за підвищених концентрацій гастрину в крові) 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 стандар-

тному раціоні віварію. 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 [16]. Четверта група щурів одночасно з інтраперитонеальним введенням омепразолу перорально отримувала Симбітер у вищезазначеній дозі. Кількість тварин у кожній експериментальній групі – 6.

Вміст дієвих кон'югатів визначали спектрофотометричним, а шифових основ – флюорометричним методами [17]. Вміст ТБК-активних продуктів визначали за реакцією з тіобарбітуровою кислотою [17]. Вміст загального білка визначали за методом Лоурі [18].

Епітеліоцити ворсинок та крипт із ДПК ізолювали за допомогою низькотемпературного методу [19]. РНК отримували за методом Chomczynski [20]; кДНК синтезували в 20 мкл реакційної суміші, яка містила 2 мкл РНК, 1 мМ dNTP, 200 од. зворотної транскриптази (3Т) "Thermo Scientific RevertAid Reverse Transcriptase", відповідний буферний розчин, 20 од. рибонуклеазного інгібітору "Thermo Scientific RiboLock RNase Inhibitor" ("Thermo Scientific", Литва), 1 мкМ зворотного праймеру. Синтез тривав за наступних умов: 65° С – 5 хв, 45° С – 1 год. Полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) проводили в 30 мкл реакційної суміші, що містила 3 мкл кДНК, буферний розчин для ПЛР, по 200 мкМ кожного dNTP ("Thermo Scientific"), по 1 мкМ кожного праймера, до 2,5 мМ MgCl₂ та 1 од. Taq ДНК полімерази ("Taq DNA Polymerase (recombinant)", "Thermo Scientific"). Ампліфікацію фрагментів ДНК здійснювали за таких температурних умов: початкова денатурація 95° С – 3 хв.; дали 35 циклів (для *Actb* (ген β-актину, що використовується в якості внутрішнього контролю реакції завдяки конститутивній експресії) – 28 циклів): денатурація ДНК 95° С – 1 хв.; гібридизація праймерів 45° С – 45 с для *Tlr2* (456 п. н.) та 49° С – 40 с. для *Actb* (521 п. н.); добування ланцюга 72° С – 1 хв. 15 с. (для *Tlr2*) або 1 хв. (для *Actb*). Після цього проводили добудову ампліфікатів при 72° С – 5 хв.

У реакціях було використано такі послідовності праймерів: для *Tlr2* – прямий – GGAGGTCTCCAGGTCAAATCT та зворотний – TGATGTTTCCCCAGTGTCC ; для *Actb* – прямий – TGGGACGATATGGAGAAGAT та зворотний – ATTGCCGATAGTGATGACCT. Відтворюваність результатів ампліфікації було перевірено в паралельних експериментах шляхом повторення ПЛР на кДНК усіх тварин, із кожним праймером не менше трьох разів.

Розділення продуктів ПЛР проводили електрофоретично в 1,6% агарозному гелі ("Agarose LE", "Roche", Німеччина), у 0,5-кратному ТВЕ-буферному розчині при напруженні електричного поля 5-10 В/см. Для напівкількісного аналізу експресії ампліконів на основі денситометрії було використано програму ImageJ 1.45s ("NIH",

США). Індекси експресії гена визначали для кожного зразка за Konturek [et al.] [21].

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. Результати вважали значущими, коли $p \leq 0,05$.

Результати та їх обговорення. Показано інтенсифікацію ПОЛ за досліджуваних умов. Так, введення омепразолу щурам упродовж 28 днів призводило до суттєвого підвищення концентрації первинних, проміжних та кінцевих продуктів пероксидації ліпідів у клітинах ДПК: в епітеліоцитах ворсинок – в 1,7 ($p \leq 0,001$), 1,6 ($p \leq 0,001$), 1,5 ($p \leq 0,001$) рази, у крипах – у 2,1 ($p \leq 0,001$), 2,3 ($p \leq 0,001$), 1,8 ($p \leq 0,001$) рази, відповідно, у порівнянні з контрольними значеннями [22]. У щурів, котрі разом з омепразолом отримували мультипробіотик, зазначені показники наближались до контрольних значень, у той час як у тварин другої групи вміст продуктів ПОЛ переважно був нижчим за контроль [22].

Отже, на першому етапі дослідження виявлено активацію ліпідної пероксидації у клітинах ДПК за гіпоацидних умов та показано пригнічення процесів ПОЛ за умов введення мультипробіотика Симбітер.

У результаті проведених нами експериментальних досліджень було виявлено експресію мРНК гена *Tlr2* (продукт 3Т-ПЛР розміром – 456 п.н.) у зразках епітеліоцитів ворсинок і крипт ДПК як контрольної, так і другої групи тварин, які отримували мультипробіотик Симбітер (рис. 1).

Рівні експресії гена *Tlr2* в контрольній та другій групі епітеліоцитів крипт значуще не відрізнялися, так само як і у ворсинках, на відміну від типів епітеліальних клітин. Рівні експресії цього гена в третій та четвертій групах як ворсинок, так і крипт епітелію ДПК значуще відрізнялися, як і між типами епітеліальних клітин ($p \leq 0,0001$) (рис. 1.).

Було показано, що рівень експресії гена *Tlr2* в епітеліальних клітинах ворсинок і крипт ДПК щурів у контролі становив, відповідно, $0,092 \pm 0,0098$ та $0,101 \pm 0,0087$ відносно *Actb* (рис. 1). За умов тривалого пригнічення кислотопродукуючої функції шлунка щурів цей показник був вищим: в епітеліоцитах ворсинок – у 3,2 рази ($p < 0,0001$), в епітеліоцитах крипт – у 2,6 рази ($p < 0,0001$) відносно контролю. Таким чином, виявлене нами підвищення рівня експресії гена *Tlr2* епітеліальних клітин ворсинок та крипт ДПК щурів за умов довготривалого пригнічення кислотоутворення в шлунку свідчить про бактеріальну колонізацію ДПК.

Показано, що рівень мРНК гена *Tlr2* в епітелії ворсинок ДПК щурів, які разом з омепразолом отримували мультипробіотик, був у 5 та 1,6 рази нижчим ($p < 0,0001$), ніж у тварин третьої і контрольної груп, відповідно. За аналогічних умов зазначений показник у клітинах епітелію крипт знизився в 1,6 рази ($p < 0,0001$) по відношенню до показників групи з гіпоацидним станом шлунка та збільшився в 1,7 рази ($p < 0,0001$) відносно контролю.

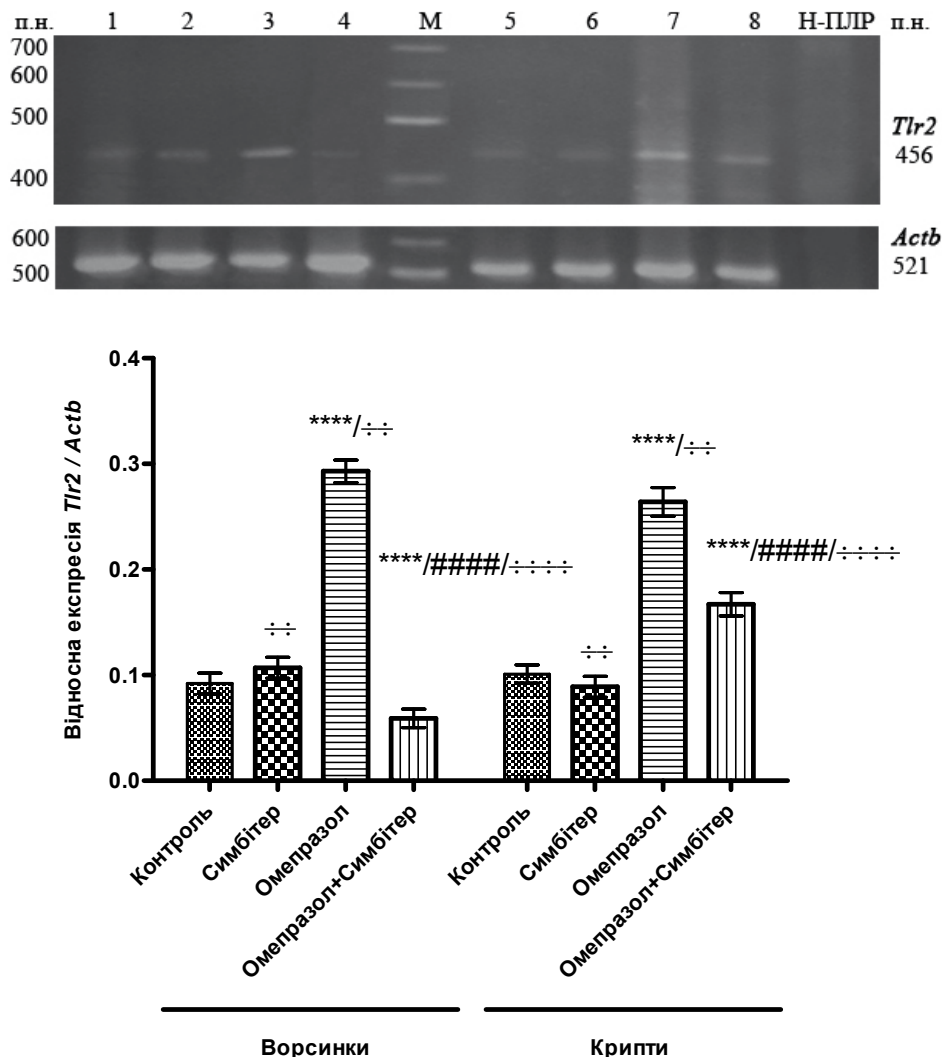


Рис. 1. Рівень експресії мРНК гена *Tlr2* в різних типах епітеліальних клітин дванадцятипалої кишки щурів за умов тривалої гіпоацидності та при введенні мультипробіотика Симбітер.

М – маркер молекулярної маси; епітеліоцити ворсинок: 1 – контроль; 2 – Симбітер; 3 – омепразол; 4 – омепразол + Симбітер; епітеліоцити крипти: 5 – контроль; 6 – Симбітер; 7 – омепразол; 8 – омепразол + Симбітер; Н-ПЛР – негативний контроль ПЛР; **** – $p \leq 0,0001$ відносно контролю; ##### – $p \leq 0,0001$ відносно тварин, яким вводили лише омепразол; **** – $p \leq 0,0001$, ++ – $p \leq 0,01$ ворсинки порівняно з криптами

TLR – давня та еволюційно консервативна родина рецепторів, які відіграють важливу роль у формуванні вродженого імунітету та запальних процесів [23]. TLR розпізнають консервативні патоген-асоційовані молекулярні патерни (PAMPs), які є властивими великій групі мікроорганізмів, і залучені до індукції вродженої та набуті імунної відповіді [23, 24].

Ентероцити можуть не відповідати на дію TLR-агоністів. За відсутності хвороби клітини кишковика синтезують TLR3 і TLR5 і на низькому рівні TLR2 та TLR4. Недостатність TLR2 і TLR4 є можливою причиною нечутливості клітин кишковика до коменсальних бактерій. Крім того, у цих клітинах синтезується у великій кількості TOLLIP, який інгібує TLR2- і TLR4-шляхи, тим самим захищаючи від хронічної запальної відповіді до коменсальних бактерій [8].

Тривала гіпоацидність шлунка призводить до бактеріальної колонізації ДПК та розвитку дисбіозу. За цих умов відбувається активація Toll-like рецепторів на поверхні епітеліальних клітин, що узгоджується з виявленим нами підвищенням експресії гена *Tlr2*, наслідком чого є розвиток запального процесу [8, 10-12]. При цьому відбувається вивільнення прозапальних цитокінів,

зокрема ІЛ-2, ІЛ-8, ФНП- α тощо на фоні зниження протизапального ІЛ-10 [24]. Вищезазначені цитокіни індукують синтез молекул клітинної адгезії (МКА) на плазматичній мембрані нейтрофілів й ендотеліоцитів, що, у свою чергу, призводить до міграції нейтрофілів із мікроциркуляторного русла в тканини ДПК [4]. Активація нейтрофілів зумовлює подальше збільшення продукування прозапальних цитокінів, зростання синтезу МКА, підвищення проникності судин та генерації АФК в епітеліоцитах ДПК. Вивільнення цитокінів та зростання синтезу МКА сприяють ще більшій міграції нейтрофілів, що, у свою чергу, обумовлює цикл запалення, наслідком чого стає посилена генерація АФК та розвиток ОС [4, 24].

Отже, встановлені зміни експресії гена *Tlr2* в епітеліоцитах ворсинок та крипти за умов тривалої шлункової гіпоацидності свідчать про розвиток патологічних процесів у тканині ДПК, зокрема запалення. При цьому продемонстровано ключову роль саме дисбіозу травного тракту в ініціації пошкодження епітеліоцитів та визначено, що до біохімічних механізмів ушкодження ДПК за умов тривалої шлункової гіпоацидності залучаються реакції ліпідної пероксидації, що посилюється за цих умов, та експресія гена *Tlr2*, рівень якої зростає як від-

повідь на патогенну мікрофлору. Виявлені відмінні рівні експресії та змін експресії проаналізованого гена в епітеліальних клітинах ворсинок і крипт обумовлені структурно-функціональними особливостями клітин ДПК, зокрема наявністю в складі крипт клонів низькодиференційованих проліферативних клітин, яким властива менша стійкість до ОС порівняно з високодиференційованими ворсинками [4]. Окрім цього, відомо, що на ранніх стадіях запальних захворювань тонкої кишки, зокрема ДПК, у першу чергу пошкоджуються епітеліоцити крипт за рахунок міграції нейтрофілів із судин у просвіт крипт, що призводить до формування криптових абсцесів [4].

Нормалізація експресії гена *Tlr2* при застосуванні мультипробіотичного препарату також свідчить про істотний внесок дисбіотичних порушень у патологічні процеси, що відбуваються в епітеліоцитах ДПК за умов тривалої гіпохлоргідрії.

Щодо можливих механізмів впливу мультипробіотика Симбітер на експресію генів у ДПК, перш за все, слід зазначити його здатність еліминувати бактеріальну колонізацію ШКТ та дисбіоз [13, 14]. Ефективність дії досліджуваного препарату пов'язана з широким спектром його біологічної активності (продукти життєдіяльності бактеріальних штамів, представлених в препараті Симбітер: 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) та високим рівнем безпечності для організму [7, 14-16 25].

Висновки. Показано, що тривале експериментальне гальмування кислотної секреції шлунка супроводжується зміною експресії гена *Tlr2* в епітеліоцитах ДПК щурів. 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 гена *Tlr2* в розвиток запального процесу в ДПК, обумовленого дисбіотичними змінами за умов тривалої гіпохлоргідрії.

Список використаних джерел.

- Shin J. 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>
- 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.] // Pharmacoeconomics and drug safety. – 2006. – Vol. 15, N 3. – P.141–149. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- Johnson D. A. Reported side effects and complications of long-term proton pump inhibitor use / D. A. Johnson, I. V. EC Oldfield // Clinical gastroenterology and hepatology. – 2013. – Vol. 11 – P.458–464. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- Physiology of the gastrointestinal tract. 4th edition / K. Barrett, F. Ghishan, J. Merchant [et al.] – New York : Academic Press, 2006. – 2080 p. Available from: <http://www.sciencedirect.com>
- 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>
- Zhang R. Myeloperoxidase functions as a major enzymatic catalyst for initiation of lipid peroxidation at sites of inflammation / R. Zhang, M. L. Brennan, Z. Shen [et al.] // The journal of biological chemistry. – 2002. – Vol. 277. – P.46116–46122. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- Дворченко К.О. Вплив окисного стресу на рівень експресії генів TGF- β і HGF у печінці щурів в умовах тривалої шлункової гіпохлоргідрії та за введення мультипробіотика Симбітер / К.О. Дворченко, О.О. Берник, А.С. Драничина [та ін.] // Український біохімічний журнал. – 2013. – Т. 85, №5. – С. 114–123.
- Frolova L. 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 / L. Frolova, P. Drastich, P. Rossmann [et al.] // Journal of histochemistry and cytochemistry. – 2008. – Vol. 56. – P.267–274. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

9. Takeuchi O. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of Gram-negative and Gram-positive bacterial cell wall components / O. Takeuchi, K. Hoshino, T. Kawai [et al.] // Immunity. – 1999. – Vol. 11. – P.443–451. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

10. McMahon L. Expression of Toll-like receptor 2 in duodenal biopsies from dogs with inflammatory bowel disease is associated with severity of disease / L. McMahon, A. House, B. Catchpole [et al.] // Veterinary immunology and immunopathology. – 2010. – Vol. 135. – P.158–163. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

11. Burgener I. A. Upregulation of Toll-like receptors in chronic enteropathies in dogs / I. A. Burgener, A. König, K. Allenspach [et al.] // Journal of veterinary internal medicine. – 2008. – Vol. 22. – P.553–560. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

12. Szebeni B. Increased expression of Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in the colonic mucosa of children with inflammatory bowel disease / B. Szebeni, G. Veres, A. Dezsofi [et al.] // Clinical and experimental immunology. – 2008. – Vol. 151. – P. 34–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

13. Абдулахад К. Ф. А. Дослідження впливу мультипробіотиків групи "Симбітер" на секреторну функцію шлунка у щурів в умовах тривалої гіпергастринемії: автореф. дис. канд. біол. наук: 03.00.13 / Абдулахад Кусай Ф. Абдулахад; Київ: нац. ун-т ім. Тараса Шевченка. – К., 2012. – 20 с.

14. 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>

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

16. 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>

17. Гаврилов В.Б. Измерение диеновых конъюгатов в плазме крови по УФ-поглощению гептановых и изопропанольных экстрактов / В.Б. Гаврилов, А.П. Гаврилова, Н.Ф. Хмара // Лабораторное дело. – 1988. – № 2. – С. 60–63.

18. Lowry O. H. 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>

19. 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>

20. 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>

21. Konturek P. Activation of genes for spasmolytic peptide, transforming growth factor alpha and for cyclooxygenase COX-1 and COX-2 during gastric adaptation to aspirin damage in rats / P. Konturek, T. Brzozowski, P. Pierzchalski [et al.] // Alimentary pharmacology and therapeutics. – 1998. – Vol. 12 (8). – P. 767–777. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

22. Савко У. В. Біохімічні механізми пошкодження епітеліоцитів дванадцятипалої кишки щурів за умов тривалої пригнічення секреції гідрохлоридної кислоти у шлунку: автореф. дис. ... канд. біол. наук: 03.00.04 / Савко Ульяна Вікторівна; Київ: нац. ун-т ім. Т. Шевченка. – К., 2014. – 20 с.

23. Aderem A. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response / A. Aderem, R. J. Ulevitch // Nature. – 2000. – Vol. 406, № 6797. – P. 782–787. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

24. Gene expressions of Toll-like receptor 2, but not Toll-like receptor 4, is induced by LPS and inflammatory cytokines in mouse macrophages / T. Matsuguchi, T. Musikacharoen, T. Ogawa [et al.] // The journal of immunology. – 2000. – Vol. 165. – P.5767–5772. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

25. Lutgendorff F. Probiotics enhance pancreatic glutathione biosynthesis and reduce oxidative stress in experimental acute pancreatitis / F. Lutgendorff, L. M. Trullsson, 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>

Надійшла до редколегії 10.04.15

А. Драничина, канд. біол. наук, Е. Дворченко, д-р біол. наук, А. Моргаченко, канд. біол. наук, Л. Остапченко, д-р біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА *TLR2* В ЭПИТЕЛИОЦИТАХ ДВЕНАДЦАТИПЕРСТНОЙ КИШКИ КРЫС ПРИ ДЛИТЕЛЬНОЙ ЖЕЛУДОЧНОЙ ГИПОХЛОРИДРИИ И ПРИ ВВЕДЕНИИ МУЛЬТИПРОБИОТИКА СИМБИТЕР

Показано увеличение уровня экспрессии гена *Tlr2* в эпителиоцитах ворсинок и крипт двенадцатиперстной кишки крыс в гипоацидных условиях. При введении мультипробіотика "Симбітер" в тех же условиях уровень экспрессии данного гена в эпителиоцитах ворсинок и крипт приближался к контрольным значениям.

Ключевые слова: желудочная гипоацидность, двенадцатиперстная кишка, экспрессия гена *Tlr2*, мультипробіотик.

A. Dranitsina, PhD., K. Dvorchshenko, DSc, O. Morgaienko, PhD., L. Ostapchenko, DSc.
Taras Shevchenko national university of Kyiv, Kyiv, Ukraine

EXPRESSION OF *TLR2* GENE IN RAT DUODENAL UPON LONG-TERM GASTRIC HYPOCHLORHYDRIA AND WITH ADMINISTRATION OF MULTIPROBIOTIC SYMBITER

The increasing of Tlr2 gene's expression in rat duodenal villus and crypt epithelial cells upon gastric hypoacidic conditions was shown. The level of Tlr2 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, *Tlr2* gene expression, multiprobiotic.

УДК 611.018.83:615.373]-092.4

Н. Храновська, канд. біол. наук, О. Скачкова, канд. біол. наук, О. Горбач, мол. наук. співр.
Національний інститут раку, Київ,
Г. Потебня, д-р мед. наук, проф.,
Інститут експериментальної патології, онкології та радіобіології імені Р.Є.Кавецького НАН України, Київ,
Р. Сидор, асп.
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ

ФЕНОТИПОВІ ТА ФУНКЦІОНАЛЬНІ ВЛАСТИВОСТІ ГЕНЕРОВАНИХ ДЕНДРИТНИХ КЛІТИН ЛЮДИНИ ПІСЛЯ ОБРОБКИ ЦИТОТОКСИЧНИМИ ЛЕКТИНАМИ *B. subtilis* B-7025

*Розглянуто фенотипові та функціональні властивості генерованих дендритних клітин людини після обробки цитотоксичними лектинами *B. subtilis* B-7025.*

Ключові слова: дендритні клітини, цитотоксичні лектини, *B. subtilis* B-7025, фенотипові та функціональні властивості.

Вступ. Відомо, що найбільш потужні антигенпрезентуючі клітини імунної системи – дендритні клітини (ДК) відрізняються високою пластичністю, та, в залежності від умов мікрооточення, можуть досягати функціонального дозрівання та набувати імуногенності. Так, залежно від складу середовища, умов культивування клітин-попередників, факторів дозрівання та ін. можна отримати ДК з різними властивостями. Одні з них будуть індукувати імунну відповідь за Тх1 / Тх2 типом, інші, навпаки, активувати регуляторні Т-лімфоцити (Трег) і призводити до імуносупресії (толерогенні ДК). Відомо, що фактори дозрівання, які додають до ДК при інкубації з антигеном, істотно впливають на їх здатність до міграції в лімфатичні вузли та презентації антигенів Т-лімфоцитам [1]. Дозрівання ДК індукують різноманітні стимули, наприклад, прозапальні цитокіни, с-KitL та FLT3L (ліганди тирозин-кіназного рецептора), зв'язування рецептора CD40, взаємодія певних макромолекул вірусів та бактерій (двуспіральна РНК, ДНК, ліпополісахарид (ЛПС), простагландин E2 (PGE2) та CpG послідовності ДНК бактерій з певними рецепторами сімейства Toll Like (TLR) [2,3].

Разом з тим, слід зазначити, що найбільш оптимальні комбінації індукторів дозрівання та способи навантаження пухлинними антигенами для використання ДК в імунотерапії раку не встановлені, а протоколи одержання функціонально зрілих ДК не стандартизовані, тому пошук найбільш оптимальних поєднань факторів для одержання функціонально зрілих ДК, придатних для використання у складі протипухлинних вакцин, залишається актуальною проблемою [4].

Відомо, що бактеріальні штами продукують поверхневі лектини. Показано, що бактерії *B. subtilis* B-7025 (штам депонований в Інституті мікробіології і вірусології Національної академії наук України) мають підвищену здатність синтезувати позаклітинні цитотоксичні лектини (ЦЛ) з унікальними властивостями. За хімічною природою ці лектини є глікопротеїнами, молекулами, що складаються з трьох поліпептидних ланцюгів з MM 8300 Da, утворюючи конгломерати. ЦЛ мають імуномодулюючу та протипухлинну активність. Вони здатні вибірково стимулювати Т- і В-лімфоцити, стимулювати продукцію інтерферонів (IFN) в різних біологічних системах. Ці ЦЛ використовують в якості компонента в протипухлинних вакцинах. Лізати пухлинних клітин, одержані за допомогою ЦЛ, були використані нами для

навантаження ДК при створенні протипухлинної вакцини на основі цих клітин [5]. Разом з тим, ефекти ЦЛ на фенотипові та функціональні властивості генерованих ДК людини не досліджені.

Мета роботи полягала у дослідженні фенотипових та функціональних властивостей генерованих дендритних клітин людини після обробки цитотоксичними лектинами *B. subtilis* B-7025.

Матеріали і методи. Для генерації ДК були використані мононуклеарні клітини периферичної крові 10 практично здорових людей. Клітини в концентрації 1×10^6 кл / мл поміщали в 24-лункові планшети для культивування протягом 2 годин в 3 мл повного живильного середовища RPMI-1640, 100 мкг/мл гентаміцину і 5% ембріональної телячої сироватки. Фракцію клітин, що не прилипали, видаляли, а ті, що залишилися, інкубували в повному культуральному середовищі в присутності 40нг / мл гранулоцит-макрофаг колоніє стимулюючого фактору (GM-CSF) протягом 6 діб при 37° С в CO₂-інкубаторі при 5% CO₂. Після 6 діб культивування до незрілих ДК додавали ЦЛ *B. subtilis* B-7025 в концентраціях 0,04, 0,1 або 0,4 мг/мл та інкубували ще протягом 24 години.

Фенотиповий аналіз генерованих ДК проводили за допомогою методу проточної цитофлуориметрії за експресією поверхневих маркерів: CD83, CD86, HLA-DR. Рівень експресії генів інтерлейкін (IL)-12p40, IL-12p35, фактор некрозу пухлини (TNF)(α), IL-10, трансформуючий фактор росту (TGF)- β визначали за допомогою полімеразно-ланцюгової реакції (ПЛР) з детекцією результатів в режимі реального часу з використанням специфічних праймерів, TaqMan зондів або флуорохромів SYBRGreen. Рівні експресії генів-мішеней оцінювали за допомогою методу $\Delta\Delta Ct$ з нормуванням щодо експресії ендогенного контролю.

З метою дослідження активності ДК в реакції змішаної культури лейкоцитів (ЗКЛ), їх інкубували з аутологічними лімфоцитами протягом 20 діб. Після закінчення інкубації визначали кількість CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ та CD4⁺IFN- γ ⁺, CD4⁺IL-4⁺, CD8⁺IFN- γ ⁺ – лімфоцитів в культурі.

Статистичну обробку даних проводили з використанням програмного пакету Statistica 6.1. Достовірність відмінностей між групами оцінювали за допомогою методів параметричної (t – критерій Стюдента) і непараметричної статистики (критерій Вілкоксона-Манна-Уїтні). Відмінності вважали статистично достовірними при $p < 0,05$.