МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

САВКО УЛЬЯНА ВІКТОРІВНА

УДК 616.33-008.821.14:612.336

БІОХІМІЧНІ МЕХАНІЗМИ ПОШКОДЖЕННЯ ЕПІТЕЛІОЦИТІВ ДВАНАДЦЯТИПАЛОЇ КИШКИ ЩУРІВ ЗА УМОВ ТРИВАЛОГО ПРИГНІЧЕННЯ СЕКРЕЦІЇ ГІДРОХЛОРИДНОЇ КИСЛОТИ У ШЛУНКУ

03.00.04 – біохімія

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2014

Дисертацією є рукопис
Робота виконана на кафедрі біохімії ННЦ «Інститут біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка МОН України

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор
Остапченко Людмила Іванівна,
Київський національний університет
імені Тараса Шевченка МОН України,
директор ННЦ «Інститут біології»

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, старший науковий співробітник
Шликов Сергій Георгійович,
Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України,
провідний науковий співробітник відділу біохімії м'язів

доктор медичних наук, професор
Скляров Олександр Якович,
Львівський національний медичний університет
імені Данила Галицького МОЗ України,
завідувач кафедри біологічної хімії

Захист відбудеться « 29 » вересня 2014 року о 14 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.001.24 Київського національного університету імені Тараса Шевченка МОН України за адресою: м. Київ, проспект Академіка Глушкова, 2, ННЦ «Інститут біології», ауд. 434

Поштова адреса: 01601, м. Київ, вул. Володимирська, 64 / 13, Київський національний університет імені Тараса Шевченка, ННЦ «Інститут біології», спеціалізована вчена рада Д 26.001.24

З дисертацією можна ознайомитись в Науковій бібліотеці ім. М. Максимовича Київського національного університету імені Тараса Шевченка за адресою: м. Київ, вул. Володимирська, 58

Автореферат розісланий « 27 » серпня 2014 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради Т.Р. Андрійчук

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Значну кількість патологічних станів органів травної системи супроводжує знижена кислотність шлункового соку, яка виникає внаслідок порушення секреції гідрохлоридної кислоти парієтальними клітинами (ПК) шлунка [Kitchen J., 2001]. До факторів, що сприяють розвитку гіпохлоргідрії, належать: патологічні стани шлунка (атрофічний гастрит, хронічний гіпертрофічний поліаденоматозний гастрит тощо), інфікування *Helicobacter pylori*, аутоімунні захворювання, тривалий стрес, а також вікові зміни організму [Beales I., 1998; Kitchen J., 2001; Jensen R., 2006; Salles N., 2007].

Особливу увагу привертає група препаратів, які гальмують секрецію кислоти ПК шлунка: інгібітори H^+/K^+-АТФази (інгібітори протонної помпи (ІПП) - омепразол, лансопразол, рабепразол, пантопразол, езомепразол тощо); блокатори м-холінорецепторів (пірензепін та ін.); антагоністи H_2-гістамінових рецепторів (ранітидин, циметидин, нізатидин і фамотидин). Будучи достатньо безпечними, вони, тим не менше, здатні призводити до підвищення рівня гастрину в крові (гіпергастринемія) [Brand S., 1988; Kitchen J., 2001; Цирюк О., 2007; Fossmark R. 2008]. Встановлено, що гіпергастринемія здатна призводити до атрофічних змін клітин шлунка та метаплазії його тканин, а також до виникнення спорадичних пухлин в інших органах травної системи, зокрема у дванадцятипалій кишці (ДПК) [Gregor I., 1976; Jensen R., 2006; Merchant S., 2006; Thomson A., 2010]. Розвиток дисбіозу є одним з ключових наслідків тривалої гіпоацидності шлунка, оскільки при цьому відбувається колонізація шлунково-кишкового тракту (ШКТ), зокрема і ДПК, умовно-патогенною мікрофлорою, яка викликає тривалу ендогенну інтоксикацію [Pereira S., 1998; Chey W., 2010; Wallace J., 2011; Lo W, 2013]. Накопичення прозапальних молекул з джерела ендогенного запалення і вплив клітинних та секреторних компонентів дисбіотичної мікрофлори можуть призводити до розвитку запалення, наслідком чого стає потужна генерація активних форм кисню та ініціація окисного стресу (ОС).

Протягом останнього часу з’явилися дані про те, що тривалий прийом ІПП може бути асоційований із підвищенням ризику виникнення ентеропатій [Dorta G., 2000; Merchant S., 2006; Wallace J., 2011; Lo W, 2013]. Наявний механізм, що лежить в основі патологій ДПК за умов прийому препаратів, що блокують секрецію гідрохлоридної кислоти, гіпохлоргідрії, дисбіозу або гіпергастринемії, на сьогодні невідомий.

З’ясування ролі ОС та дисбіотично-запального шляху в розвитку пошкоджень ДПК за умов тривалої гіпохлоргідрії є актуальним питанням гастроентерології. Встановлення молекулярних та біохімічних механізмів ураження епітеліальних клітин ДПК щурів при тривалому гіпоацидному стані шлунка дозволить доповнити уявлення про побічні наслідки тривалого використання блокаторів кислотної секреції, охарактеризувати роль дисбіотичних розладів та розробити нові медико-профілактичні засоби для запобігання уражень ДПК за умов тривалої гіпохлоргідрії, що є важливим для пацієнтів із кислото-залежними захворюваннями.

Все вищезазначене є підґрунтям для проведення досліджень за темою

представленої роботи.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота виконана на кафедрі біохімії ННЦ "Інститут біології" Київського національного університету імені Тараса Шевченка МОН України в рамках науково-дослідної теми "Механізми реалізації адаптаційно-компенсаторних реакцій організму за умов розвитку різних патологій" № д/р 0111U004648 (2011-2015 рр.), № 11БФ036-01.

Мета і задачі дослідження. Мета роботи – з'ясувати біохімічні механізми пошкодження епітеліоцитів дванадцятипалої кишки щурів за умов тривалого пригнічення секреції гідрохлоридної кислоти у шлунку. Для досягнення мети були поставлені такі задачі:

1. Визначити інтенсивність вільнорадикальних процесів (ксантиноксидазну активність, вміст активних форм кисню (АФК) та нітрогену (АФН), продуктів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) та окисної модифікації білків (ОМБ)) у клітинах епітелію дванадцятипалої кишки щурів на фоні тривалої гіпохлоргідрії шлунка.

2. Оцінити стан антиоксидантної системи (АОС) (активність ферментів першої лінії захисту, глутатіон-залежних ензимів, вміст сульфгідрильних груп та металотіонеїнів) в епітеліальних клітинах дванадцятипалої кишки щурів за умов тривалого гальмування кислотної секреції шлунка.

3. Встановити рівень експресії генів (*Cckbr, Nos2, Par2, Reg1a, Tgfb1, Gast, Chga, Defa, Tlr2*), задіяних у розвиток запалення, гіпертрофії, регенерації та відповіді на патогенну мікрофлору дуоденальних клітин щурів при тривалому послабленні кислотопродукуючої функції шлунка.

4. Порівняти вищезазначені показники у епітеліоцитах крипт та ворсинок дванадцятипалої кишки щурів із хронічним пригніченням секреції гідрохлоридної кислоти у шлунку.

5. Порівняти зміни розглянутих показників дуоденальних клітин щурів при дисбіозі та за умов відновлення нормальної мікрофлори шляхом введення мультикомпонентного пробіотика на фоні тривалої гіпохлоргідрії.

Об'єкт дослідження – біохімічні механізми пошкодження епітеліальних клітин ДПК щурів за умов тривалого послаблення кислотопродукуючої функції шлунка.

Предмет дослідження – стан окисно-антиоксидантної рівноваги та рівень експресії генів в епітеліоцитах ДПК щурів при тривалому пригніченні секреції гідрохлоридної кислоти у шлунку.

Методи дослідження. Ультрацентрифугування (виділення клітинних фракцій), спектрофотометричні (визначення вмісту вільних радикалів, продуктів перекисного окиснення ліпідів, окисної модифікації білків, ферментативної активності про- та антиоксидантних ферментів), флуоресцентні (визначення вмісту шиффових основ), молекулярно-генетичні (визначення рівня експресії генів) та методи математичної статистики.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше проведено порівняльну характеристику біохімічних механізмів пошкодження епітеліальних клітин ворсинок

та крипт ДПК щурів за умов тривалого пригнічення секреції гідрохлоридної кислоти у шлунку. Показано зсув окисно-антиоксидантної рівноваги в напрямку інтенсифікації прооксидантних процесів та розвитку окисного стресу на фоні зниження антиоксидантних властивостей клітин епітелію ДПК щурів при тривалій гіпохлоргідрії шлунка. Доведено зміну експресії ряду генів, що залучені до розвитку запалення, гіпертрофії, регенерації та відповіді клітин на патогенну мікрофлору, що вказує на стресову відповідь епітеліоцитів ДПК щурів за умов тривалого гіпоацидного стану шлунка. Вперше проведено дослідження ролі дисбіотичних розладів у розвитку пошкоджень епітеліальних клітин ДПК щурів на фоні тривалого пригнічення кислотопродукуючої функції шлунка. Встановлено, що дисбіотичні порушення відіграють вагому роль у змінах вищевказаних біохімічних показників клітин епітелію ДПК щурів за даних умов. Вперше відмічено здатність мультипробіотиків здійснювати нормалізуючий вплив на пошкодження епітеліоцитів ДПК щурів при тривалому гіпоацидному стані шлунка. Запропоновано застосування мультикомпонентних пробіотичних препаратів як терапевтичних засобів для профілактики уражень ДПК на фоні тривалого пригнічення секреції гідрохлоридної кислоти у шлунку.

Практичне значення одержаних результатів. Результати роботи доповнюють існуючі дані про молекулярні та біохімічні механізми ураження епітеліальних клітин ворсинок та крипт ДПК щурів за умов тривалого гіпоацидного стану шлунка. Результати дисертації розширюють уявлення про механізми наслідків тривалого використання блокаторів кислотної секреції шлунка. Визначена роль дисбіотичних розладів у пошкодженні епітеліоцитів ДПК щурів при тривалій гіпохлоргідрії шлунка, що підтверджує сучасну теорію дисбіозу. Вперше доведено здатність мультикомпонентних пробіотиків підтримувати гомеостаз ДПК. Теоретичні та практичні положення дисертаційної роботи можуть бути використані як основа для розробки терапевтичних підходів до профілактики ентеропатій, спричинених тривалою гіпохлоргідрією різної етіології. Результати дисертації можуть бути використані у практичній гастроентерології та у навчальному процесі під час підготовки студентів біологічних та медичних спеціальностей.

Особистий внесок здобувача. Пошук та аналіз літературних джерел, проведення експерименту, обробка та теоретичне обґрунтування результатів досліджень виконані дисертантом особисто. Формування ідеї та мети роботи, постановка завдань, планування методичних підходів, узагальнення результатів досліджень та редагування дисертаційної роботи здійснені спільно з науковим керівником. Визначення вмісту всіх про- та антиоксидантних показників в епітеліальних клітин ворсинок та крипт ДПК щурів здійснено здобувачем особисто. Вимірювання активності ферментів глутатіонової системи проводилося із консультативною допомогою к.б.н. Гайди Л.М. Визначення рівня експресії всіх проаналізованих генів проводилося за консультативної допомоги к.б.н. Драницини А.С.

Апробація результатів дисертації. Основні результати дисертаційної роботи були представлені на: X Міжнародній міждисциплінарній науковій конференції

студентів, аспірантів та молодих науковців “Шевченківська весна 2012” (Київ, 2012); 16-той Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2012); 14-том Международном Славяно-Балтийском научном форуме “Санкт-Петербург – Гастро-2012” (Санкт-Петербург, 2012); Всероссийской молодежной конференции “Актуальные проблемы химии и биологии” (Пущино, 2012); 4th International Scientific Conference “Advances in pharmacology and pathology of the digestive tract” (Kyiv, 2012); II Всероссийской с международным участием школе-конференции молодых ученых “Биология будущего: традиции и новации” (Екатеринбург, 2012); XIV конгресі світової федерації українських лікарських товариств (Донецьк, 2012); XII Всеукраїнській науковій конференції студентів, аспірантів та молодих науковців “Біологічні дослідження молодих учених в Україні” (Київ, 2012); 25th Belgian Week of Gastroenterology (Antwerp, 2013); конференції молодих вчених, присвяченій 20-річчю Національної академії медичних наук України (Київ, 2013); XI Міжнародній міждисциплінарній науковій конференції студентів, аспірантів та молодих науковців “Шевченківська весна 2013” (Київ, 2013); 17-той Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2013); 7th Lviv-Lublin conference of Experimental and Clinical Biochemistry (Lviv, 2013); International Interdisciplinary Scientific Conference Biologically active substances and materials: Fundamental and Applied Problems (Novy Svet, 2013); 21st United European Gastroenterology Week (Berlin, 2013); XII Міжнародній міждисциплінарній науковій конференції студентів, аспірантів та молодих науковців “Шевченківська весна 2014” (Київ, 2014).

Публікації. За результатами досліджень опубліковано 22 наукові праці, з яких 5 наукових статей у фахових виданнях, що відповідають вимогам МОН України, з яких одна в науковому виданні іншої держави, що індексується міжнародною наукометричною базою, а також 17 матеріалів і тез доповідей на всеукраїнських та міжнародних наукових конференціях, форумах, конгресах.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, результатів власних досліджень та їх обговорення, узагальнення, висновків та списку використаних джерел із 326 найменувань. Дисертація викладена на 164 сторінках, містить 10 рисунків та 13 таблиць.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали та методи досліджень

Всі дослідження проведено на білих нелінійних статевозрілих щурах-самцях із початковою масою 180-200 г, яких утримували на стандартному раціоні віварію.

Усіх тварин поділяли на чотири експериментальні групи. Першій групі тварин

(контроль) вводили інраперитонеально 0,2 мл та перорально 0,5 мл води для ін'єкцій один раз на добу упродовж 28 діб. Другій групі тварин вводили перорально 0,14 мл/кг мультипробіотик "Симбітер® ацидофільний концентрований" (виробництва ТОВ "О.Д. Пролісок", Україна), розчинений у 0,5 мл води для ін'єкцій, один раз на добу 28 діб. Для моделювання тривалої шлункової гіпохлоргідрії третій групі тварин вводили інраперитонеально 14 мг/кг омепразол (блокатор H^+/K^+-АТФази виробництва "Dr. Reddy's Laboratories", Індія), розчинений у 0,2 мл води для ін'єкцій, один раз на добу упродовж 28 діб. Четвертій групі тварин сумісно вводили омепразол та "Симбітер®" у вищезазначених дозах один раз на добу 28 діб.

Всього проведено 3 серії експериментів. Кількість щурів у групах кожної серії становила 10 особин. Загальна кількість тварин, залучених до експериментальних досліджень, становить 124 особини. Всі дослідження виконано відповідно до Закону України №3447-IV "Про захист тварин від жорстокого поводження" від 21 лютого 2006 р. Через добу після останнього введення препаратів щурів декапітували, відбирали зразки дванадцятипалої кишки. Епітеліоцити ворсинок та крипт з дванадцятипалої кишки ізолювали з використанням низькотемпературного методу [Flint N., 1991].

Генерацію супероксидного аніону визначали за утворенням ХТТ-формазану [Able A., 1998]. Концентрацію органічних гідропероксидів вимірювали у системі сорбітол-ксиленол оранж [Jiang Z., 1990]. Ксантиноксидазну активність оцінювали за накопиченням сечової кислоти із використанням ксантину як субстрату [Hashimoto S., 1974].

Загальну NO-синтазну активність вимірювали за накопиченням цитруліну [Salter M., 1991], а вміст нітрит-іонів – за модифікованим методом Грісса [Green L., 1992].

Вміст дієнових кон'югатів та шиффових основ визначали спектрофотометрично та флуориметрично у верхній фазі гептан-ізопропанольного екстракту [Колесова О., 1984; Гаврилов В., 1988]. Рівень ТБК-активних продуктів визначали у безбілковій фракції із додаванням ТБК [Стальная И., 1977]. Вміст продуктів окисної модифікації білків визначали за утворенням 2,4-динітрофенілгідразонів нейтрального та основного характеру [Дубинина Е., 1995].

Супероксиддисмутазну (СОД) активність оцінювали за здатністю СОД конкурувати із нітросинім тетразолієм за супероксидні аніони [Чевари С., 1985]. Каталазну активність вимірювали за кількістю незруйнованого пероксиду гідрогену у пробі [Королюк М., 1988].

Вміст відновленого глутатіону (GSH) визначали спектрофлуориметрично з використанням ортофталевого альдегіду [Hissin P., 1976]. Глутатіонпероксидазну активність оцінювали за зменшенням вмісту GSH в реакції з реактивом Елмана [Власова С., 1990]. Глутатіонредуктазну активність вимірювали за зменшенням оптичної густини проб в результаті окислення НАДФН [Власова С., 1990]. Глутатіонтрансферазну активність визначали за швидкістю утворення кон'югату GSH з 1-хлор-2,4-динітробензолом [Власова С., 1990]. Оцінку γ-глутамілтрансферазної активості проводили за накопиченням р-нітроаніліну, що утворюється в результатів

розщеплення γ-L-глутаміл-4-нітроаніліду [Dimov D., 1967].

Рівень загальних, білок-зв'язаних та небілкових сульфгідрильних груп (SH-груп) вимірювали за методом Елмана [Ellman G., 1959]. Відносний вміст металотіонеїнів визначали у частково очищеній фракції металопротеїнів після етанол-хлороформного фракціонування [Linde A., 2006].

Рівень експресії генів *Nos2*, *Par2*, *Gast*, *Chga*, *Cckbr*, *Reg1a*, *Tgfb1*, *Defa* та *Tlr2* вимірювали методом напівкількісної зворотно-транскрипційної полімеразної ланцюгової реакції із денситометрією [Sambrook J., 1989; Konturek P., 1998].

Статистичну обробку результатів дослідження проводили загальноприйнятими методами варіаційної статистики [Плохинский М., 1981]. Для аналізу виду розподілу даних був використаний W-критерій Шапіро-Уілка. Для статистичної обробки параметричних даних був використаний критерій Левана для оцінки рівності дисперсій і t-критерій Стьюдента для незалежних вибірок. Порівняння непараметричних даних проводилося за допомогою U-критерію Манна-Уітні для незалежних вибірок. Розраховували середнє значення (M) і стандартну похибку середнього (m). Значущими вважали відмінності при $p<0,05$. Розрахунки та побудову графіків виконували на комп'ютері з використанням прикладних програм: "OriginLab Origin 8.0" та „Microsoft Excel 2007".

Результати досліджень та їх обговорення

Для оцінки інтенсивності прооксидантних факторів в епітеліоцитах ДПК щурів за обраних експериментальних умов було проаналізовано ксантиноксидазну активність, вміст активних форм кисню та нітрогену, продуктів перекисного окиснення ліпідів та окисної модифікації білків.

Встановлено зростання ксантиноксидазної активності, вмісту стабільних продуктів супероксидного аніон-радикалу та пероксиду гідрогену в клітинах ДПК щурів з дисбіозом на фоні тривалого гіпоацидного стану шлунка: в епітеліоцитах ворсинок – у 1,4 ($p<0,01$), 1,6 ($p<0,001$) та 1,5 ($p<0,01$) раза, в епітеліоцитах крипт – у 2 ($p<0,001$), 2,8 ($p<0,001$) та 1,4 ($p<0,01$) раза, відповідно, по відношенню до контролю. При сумісному введенні тваринам мультипробіотика «Симбітер®» та омепразолу дані показники в обох групах дуоденальних клітин були на рівні контрольних значень (табл. 1).

Дослідження показників системи синтезу монооксиду нітрогену виявило, що при тривалому пригніченні секреції гідрохлоридної кислоти у шлунку сумарна NO-синтазна активність ДПК зростала: в епітеліоцитах ворсинок – у 4 рази ($p<0,001$), в епітеліоцитах крипт – у 3,1 раза ($p<0,001$) відносно контролю, водночас вміст нітрит-іонів перевищував контрольні значення: в епітеліоцитах ворсинок – у 2 рази ($p<0,001$), в епітеліоцитах крипт – у 1,7 раза ($p<0,001$) (табл. 2).

Таблиця 1

Показники прооксидантних факторів в епітеліоцитах дванадцятипалої кишки щурів (M ± m, n = 10)

Досліджуваний параметр / Група тварин		Накопичення супероксидного радикалу, мкмоль ХТТ-формазану × мг білка$^{-1}$	Вміст органічних гідропероксидів, мкмоль × мг білка$^{-1}$	Ксантиноксидазна активність, нмоль × хв$^{-1}$ × мг білка$^{-1}$
Контроль	ворсинки	9,86 ± 0,92	0,702 ± 0,06	4,88 ± 0,42
	крипти	12,08 ± 1,05	0,793 ± 0,07	3,99 ± 0,38
«Симбітер®»	ворсинки	8,29 ± 0,75	0,770 ± 0,08	4,06 ± 0,35*
	крипти	11,23 ± 1,19	0,743 ± 0,06	3,48 ± 0,34
Омепразол	ворсинки	15,97 ± 1,32**	1,058 ± 0,10***	6,89 ± 0,63**
	крипти	33,58 ± 3,21***	1,074 ± 0,11***	8,14 ± 0,79**
Омепразол + «Симбітер®»	ворсинки	12,09 ± 1,14$^{*/\#}$	0,741 ± 0,07$^{\#\#}$	5,14 ± 0,49$^{\#\#}$
	крипти	17,35 ± 1,69$^{***/\#\#}$	0,769 ± 0,06$^{\#\#}$	4,35 ± 0,38$^{\#\#\#}$

Примітки: *, **, *** – p<0,05, p<0,01, p<0,001 відносно контролю; #, ##, ### – p<0,05, p<0,01, p<0,001 відносно тварин, яким вводили лише омепразол

У той же час, за умов нормобіозу на фоні тривалої гіпохлоргідрії дані показники обох груп епітеліальних клітин ДПК статистично не відрізнялися від контролю (табл. 2).

Таблиця 2

Показники системи синтезу монооксиду нітрогену в епітеліоцитах дванадцятипалої кишки щурів (M ± m, n = 10)

Досліджуваний параметр / Група тварин		Загальна NO-синтазна активність, нмоль × хв$^{-1}$ × мг білка$^{-1}$	Вміст нітрит-іонів, нмоль × мг білка$^{-1}$
Контроль	ворсинки	3,41 ± 0,32	2,23 ± 0,22
	крипти	2,59 ± 0,25	1,74 ± 0,19
«Симбітер®»	ворсинки	3,69 ± 0,35	1,86 ± 0,20
	крипти	2,67 ± 0,27	1,35 ± 0,12
Омепразол	ворсинки	13,78 ± 1,07***	4,52 ± 0,46***
	крипти	7,98 ± 0,82***	2,93 ± 0,28***
Омепразол + «Симбітер®»	ворсинки	4,06 ± 0,39$^{\#\#\#}$	2,64 ± 0,27$^{\#\#\#}$
	крипти	3,14 ± 0,33$^{\#\#\#}$	2,11 ± 0,23$^{\#\#}$

Примітки: *, **, *** – p<0,05, p<0,01, p<0,001 відносно контролю; #, ##, ### – p<0,05, p<0,01, p<0,001 відносно тварин, яким вводили лише омепразол

Показано інтенсифікацію перекисного окиснення ліпідів за досліджуваних умов. Введення омепразолу щурам впродовж 28 діб призводило до істотного підвищення концентрації первинних, проміжних та кінцевих продуктів процесу в клітинах ДПК: в епітеліоцитах ворсинок – у 1,7 ($p<0,001$), 1,6 ($p<0,001$), 1,5 ($p<0,01$) раза, в епітеліоцитах крипт – у 2,1 ($p<0,001$), 2,3 ($p<0,001$), 1,8 ($p<0,001$) раза, відповідно, по відношенню до контролю (табл. 3).

У щурів четвертої групи дані показники наближались до контрольних значень, в той час як у щурів 2 групи вміст продуктів ПОЛ переважно був нижчим за контроль (табл. 3).

Таблиця 3

Вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів в епітеліоцитах дванадцятипалої кишки щурів (M ± m, n = 10)

Група тварин \ Досліджуваний параметр		Дієнові кон'югати, нмоль × мг білка$^{-1}$	ТБК-активні продукти, нмоль × мг білка$^{-1}$	Шиффові основи, ум.од. × мг білка$^{-1}$
Контроль	ворсинки	223,89 ± 20,97	23,97 ± 2,34	6,62 ± 0,64
	крипти	365,04 ± 36,12	45,61 ± 4,29	9,57 ± 0,89
«Симбітер®»	ворсинки	194,75 ± 19,03	18,94 ± 1,85*	5,95 ± 0,59
	крипти	237,35 ± 22,48**	33,29 ± 3,17**	7,27 ± 0,65*
Омепразол	ворсинки	383,91 ± 35,54***	39,31 ± 3,92***	9,81 ± 0,87**
	крипти	781,22 ± 69,82***	103,08 ± 8,61***	17,03 ± 1,64***
Омепразол + «Симбітер®»	ворсинки	302,48 ± 28,69$^{**/\#}$	32,59 ± 2,98**	8,01 ± 0,73$^{*/\#}$
	крипти	578,02 ± 53,41$^{***/\#\#}$	76,62 ± 7,63$^{***/\#}$	12,82 ± 1,27$^{*/\#}$

Примітки: *, **, *** – $p<0,05$, $p<0,01$, $p<0,001$ відносно контролю; #, ##, ### – $p<0,05$, $p<0,01$, $p<0,001$ відносно тварин, яким вводили лише омепразол

Встановлено посилення процесів окисної модифікації білків, а саме суттєве зростання рівня продуктів як основного, так і нейтрального характеру в епітеліоцитах ворсинок та крипт ДПК щурів за умов тривалої гіпохлоргідрії. Вміст окисних похідних білків в обох групах клітин епітелію ДПК при введенні мультипробіотика «Симбітер®» щурам з гіпоацидним станом шлунка знижувався відносно третьої групи та контролю.

Таким чином, виявлено інтенсифікацію прооксидантних чинників у клітинах епітелію ворсинок та крипт ДПК щурів за умов дисбіозу на фоні тривалого пригнічення секреції гідрохлоридної кислоти у шлунку, а саме зростання вмісту активних форм кисню та нітрогену, а також прогресування процесів ліпопероксидації та окисної модифікації білків. Встановлено нормалізацію перерахованих показників у епітелії ДПК щурів при введенні мультипробіотичного препарату шляхом відновлення нормофлори ШКТ.

З метою оцінки функціонального стану антиоксидантної системи ДПК щурів було визначено показники глутатіонової та глутатіон-незалежної антиоксидантних систем, а також вміст відновлених тіолів за обраних експериментальних умов.

Дослідження активності ензимів першої лінії захисту в епітеліоцитах ворсинок та крипт ДПК за умов тривалої гіпохлоргідрії виявило зниження каталазної активності у 1,3 ($p<0,05$) та 3,4 ($p<0,001$) раза на фоні підвищення супероксиддисмутазної активності 1,5 ($p<0,01$) та 2,6 ($p<0,001$) раза, відповідно, у порівнянні з контролем (табл. 4).

Якщо ж тривале пригнічення кислотної секреції шлунка супроводжувалося прийомом мультипробіотика, дані показники були істотно нижчими та наближалися до контрольних значень (табл. 4).

Визначення стану глутатіонової системи показало, що у щурів із тривалим пригніченням кислотопродукуючої функції шлунка вміст відновленого глутатіону в ДПК був нижчим, ніж у тварин контрольної групи: в епітеліоцитах ворсинок – у 1,9 раза ($p<0,001$), в епітеліоцитах крипт – у 1,7 раза ($p<0,001$). Рівень даного показника статистично не відрізнявся від контролю у епітеліоцитах ДПК щурів другої та четвертої груп.

Таблиця 4

Показники стану антиоксидантної системи в епітеліоцитах дванадцятипалої кишки щурів (M ± m, n = 10)

Досліджуваний параметр / Група тварин		Супероксид-дисмутазна активність, ум. од. × хв$^{-1}$ × мг білка$^{-1}$	Каталазна активність, нмоль H_2O_2 × хв$^{-1}$ × мг білка$^{-1}$	Вміст GSH, нмоль х мг білка$^{-1}$
Контроль	ворсинки	0,11 ± 0,01	16,43 ± 1,59	3,92 ± 0,34
	крипти	0,78 ± 0,07	33,06 ± 3,27	4,48 ± 0,42
«Симбітер®»	ворсинки	0,13 ± 0,01	14,54 ± 1,38	4,57 ± 0,43
	крипти	0,47 ± 0,04***	23,17 ± 2,31**	5,31 ± 0,48
Омепразол	ворсинки	0,16 ± 0,01**	12,63 ± 1,24*	2,05 ± 0,18***
	крипти	2,03 ± 0,18***	9,72 ± 0,89***	2,61 ± 0,25***
Омепразол + «Симбітер®»	ворсинки	0,14 ± 0,01*	33,71 ± 3,28$^{***/\#\#\#}$	3,89 ± 0,32$^{\#\#\#}$
	крипти	1,05 ± 0,09$^{*/\#\#\#}$	26,45 ± 2,36$^{*/\#\#\#}$	5,39 ± 0,53$^{\#\#\#}$

Примітки: *, **, *** – $p<0,05$, $p<0,01$, $p<0,001$ відносно контролю; #, ##, ### – $p<0,05$, $p<0,01$, $p<0,001$ відносно тварин, яким вводили лише омепразол

Встановлено зростання глутатіонпероксидазної активності у 1,3 раза ($p<0,05$) в епітеліоцитах ворсинок на фоні зниження даного показника у 1,7 раза ($p<0,001$) в епітелії крипт ДПК щурів за умов дисбіозу на фоні 28-денного гальмування кислотної секреції шлунка. Крім того, за аналогічних експериментальних умов в епітеліоцитах ворсинок та крипт ДПК встановлено зниження глутатіонредуктазної у 1,3 ($p<0,05$) та 1,6 ($p<0,001$) раза і глутатіонтрансферазної активностей у 1,3 ($p<0,05$) та 1,4 ($p<0,01$) раза на фоні підвищення у 2,1 ($p<0,001$) та 2,5 ($p<0,001$) раза гамма-глутамілтрансферазної активності, відповідно. При введенні тваринам мультипробіотика вищевказані показники статистично не відрізнялися від контролю (табл. 5).

Таблиця 5

Показники стану глутатіон-залежної антиоксидантної системи в епітеліоцитах дванадцятипалої кишки щурів (M ± m, n = 10)

Досліджуваний параметр / Група тварин		Глутатіонпероксидазна активність, нмоль GSSG х хв$^{-1}$ х мг білка$^{-1}$	Глутатіонредуктазна активність, нмоль НАДФН х хв$^{-1}$ х мг білка$^{-1}$	Глутатіонтрансферазна активність, нмоль х хв$^{-1}$ х мг білка$^{-1}$
Контроль	ворсинки	517,84 ± 49,23	46,29 ± 4,21	142,21 ± 13,83
	крипти	637,48 ± 63,22	227,88 ± 22,19	90,15 ± 8,71
«Симбітер®»	ворсинки	604,71 ± 56,89	43,17 ± 4,15	117,61 ± 11,04
	крипти	617,85 ± 60,07	203,55 ± 20,17	74,85 ± 7,43
Омепразол	ворсинки	684,36 ± 64,15*	35,19 ± 3,42*	107,25 ± 10,12*
	крипти	367,08 ± 32,94***	146,37 ± 12,83***	64,05 ± 6,07**
Омепразол + «Симбітер®»	ворсинки	553,91 ± 52,08$^{\#}$	44,13 ± 4,39$^{\#}$	130,84 ± 11,92$^{\#}$
	крипти	602,46 ± 53,37$^{\#\#\#}$	201,12 ± 18,97$^{\#\#}$	88,21 ± 8,32$^{\#\#}$

Примітки: *, **, *** – $p<0,05$, $p<0,01$, $p<0,001$ відносно контролю; #, ##, ### – $p<0,05$, $p<0,01$, $p<0,001$ відносно тварин, яким вводили лише омепразол

Дослідження стану тіолової системи показало достовірне зниження вмісту відновлених сульфгідрильних груп – загальних, білок-зв'язаних та небілкових в епітеліальних клітинах ворсинок та крипт ДПК щурів з гіпоацидним станом шлунка. За умов введення мультипробіотика вміст вищевказаних сульфгідрильних груп суттєво зростав, наближаючись до контролю.

При тривалому пригніченні кислотопродукуючої функції шлунка омепразолом на 28 добу вміст металотіонеїнів був: в епітеліоцитах ворсинок – у 2 рази ($p<0,001$) вищим, в епітеліоцитах крипт – у 1,7 раза ($p<0,001$) нижчим відносно контролю. За умов введення мультипробіотичного препарату даний показник наближався до контрольних значень.

Таким чином, на фоні тривалого пригнічення секреції гідрохлоридної кислоти у шлунку відбувається загальне послаблення антиоксидантних систем у клітинах епітелію ворсинок та крипт дванадцятипалої кишки щурів, що проявляється у зниженні активності більшості глутатіон-залежних та незалежних антиоксидантних ензимів, а також у падінні рівня відновлених тіолів. За умов нормалізації мікрофлори травного тракту стан антиоксидантних систем подібний до контролю.

З метою оцінки молекулярно-генетичної відповіді епітелію ДПК в даних експериментальних умовах нами було визначено рівень експресії генів (*Nos2*, *Par2*, *Gast*, *Chga*, *Cckbr*, *Reg1a*, *Tgfb1*, *Defa* та *Tlr2)*, залучених до розвитку запалення, гіпертрофії, регенерації та відповіді на патогенну мікрофлору органа.

Показано зростання вмісту мРНК генів *Nos2* та *Par2*, що задіяні до ініціації запального процесу, в епітеліоцитах ворсинок у 2,9 ($p<0,001$) та 1,8 ($p<0,001$) раза і крипт у 1,5 ($p<0,01$) та 8,2 ($p<0,001$) раза за умов дисбіозу на фоні зниженої кислотопродукуючої функції шлунка. При сумісному введенні мультипробіотика та омепразолу дані показники наближались до контрольних значень (табл. 6).

Таблиця 6

Відносний рівень експресії генів за β-актином в епітеліоцитах дванадцятипалої кишки щурів (M ± m, n=6)

Параметр \ Група тварин		Контроль	"Симбітер®"	Омепразол	Омепразол + "Симбітер®"
Nos2 / *Actb*, ум.од.	ворсинки	0,052 ± 0,006	0,044 ± 0,006	0,151 ± 0,014***	0,056 ± 0,008###
	Крипти	0,033 ± 0,007	0,037 ± 0,009	0,050 ± 0,011**	0,036 ± 0,008##
Par2 / *Actb*, ум.од.	ворсинки	0,227 ± 0,022	0,217 ± 0,025	0,414 ± 0,031***	0,231 ± 0,030###
	Крипти	0,108 ± 0,021	0,101 ± 0,022	0,884 ± 0,041***	0,655 ± 0,034***/#
Gast / *Actb*, ум.од.	ворсинки	0,072 ± 0,009	0,091 ± 0,015	0,134 ± 0,016***	0,092 ± 0,014##
	крипти	0,044 ± 0,006	0,061 ± 0,008**	0,259 ± 0,015***	0,053 ± 0,010###
Chga / *Actb*, ум.од.	ворсинки	0,557 ± 0,048	0,530 ± 0,029	0,773 ± 0,095**	0,581 ± 0,045#
	крипти	0,815 ± 0,054	0,819 ± 0,031	1,61 ± 0,091***	0,866 ± 0,037###
Cckbr / *Actb*, ум.од.	ворсинки	0,051 ± 0,008	0,047 ± 0,006	0,074 ± 0,011**	0,053 ± 0,008##
	крипти	0,036 ± 0,008	0,036 ± 0,009	0,143 ± 0,014***	0,073 ± 0,009***/###
Reg1a / *Actb*, ум.од.	ворсинки	–	–	0,622 ± 0,025*	0,388 ± 0,024###
	крипти	0,305 ± 0,011	0,314 ± 0,023	0,540 ± 0,040***	0,292 ± 0,014###
Tgfb1 / *Actb*, ум.од.	ворсинки	0,670 ± 0,074	0,685 ± 0,106	2,747 ± 0,074***	0,704 ± 0,042###
	крипти	0,665 ± 0,072	0,678 ± 0,075	0,350 ± 0,057***	0,669 ± 0,094###
Defa / *Actb*, ум.од.	ворсинки	–	–	–	–
	крипти	0,320 ± 0,009	0,278 ± 0,010*	1,162 ± 0,014***	0,191 ± 0,011***/###
Tlr2 / *Actb*, ум.од.	ворсинки	0,092 ± 0,010	0,107 ± 0,010	0,293 ± 0,011***	0,059 ± 0,009***/###
	крипти	0,101 ± 0,009	0,089 ± 0,010	0,264 ± 0,014***	0,167 ± 0,011***/###

Примітки: *, **, *** – p<0,05, p<0,01, p<0,001 відносно контролю; #, ##, ### – p<0,05, p<0,01, p<0,001 відносно тварин, яким вводили лише омепразол

З метою з'ясування трофічного впливу гастрину, нами була вивчена експресія генів *Gast, Chga, Cckbr* в епітеліоцитах ДПК і показана їх зміна. Ген *Gast* кодує гормон ШКТ гастрин, який у нормі експресується виключно в ентероендокринних G-клітинах слизової оболонки антральної частини шлунка й проксимальної частини ДПК. В епітеліальних клітинах ДПК експресія гена *Chga* (продукт якого є необхідним для процесингу пропептида гістаміну) регулюється саме гастрином. Ген *Cckbr*, який кодує рецептор до гастрину/холецистокініну типу II або B - CCK_BR, опосередковує певні фізіологічні функції гастрину. Показано підвищення вмісту мРНК генів *Gast, Cckbr* та *Chga* у клітинах епітелію ворсинок у 1,9 ($p<0,001$), 1,5 ($p<0,01$) та 1,4 ($p<0,01$) раза і крипт у 5,9 ($p<0,001$), 4 ($p<0,001$) та 2 ($p<0,001$) рази, відповідно, при тривалій гіпохлоргідрії. За умов нормобіозу дані показники повертались до контрольних значень.

Зміни експресії генів *Reg1a* та *Tgfb1*, що залучені до регенеративних змін, також здатні індукувати розвиток патологічних станів. Продемонстровано наявність мРНК гена *Reg1α* в епітеліальних клітинах ворсинок ДПК у третій та четвертій групах щурів. У тварин із тривалим гіпоацидним станом шлунка даний показник клітин епітелію крипт був у 1,8 ($p<0,001$) раза вищим порівняно з контролем. Якщо ж тривале пригнічення кислотної секреції шлунка супроводжувалося прийомом мультипробіотика, то рівень мРНК гена *Reg1α* клітин епітелію ворсинок та крипт ДПК знизився у 1,6 ($p<0,001$) та 1,8 ($p<0,001$) раза, відповідно, по відношенню до тварин, яким вводили лише омепразол.

Дослідження рівня експресії гена першої ізоформи трансформуючого фактору росту β виявило підвищення у 4,1 ($p<0,001$) раза вмісту мРНК *Tgfb1* у клітинах епітелію ворсинок та зниження у 1,9 ($p<0,001$) раза - у епітеліоцитах крипт при тривалому пригніченні кислотопродукуючої функції шлунка. За умов введення мультипробіотика даний показник статистично не відрізнявся від контролю.

Індукцію експресії гена *Defa*, який кодує попередник α-дефензину 5, нині пов'язують із дисбіотичними процесами у ДПК. Вказаний ген експресується клітинами Панета, що локалізуються в базальних відділах кишкових крипт. Встановлено відсутність відносного вмісту мРНК гена *Defa* в епітеліальних клітинах ворсинок ДПК у всіх групах щурів. У тварин, яким вводили омепразол протягом 28 діб, цей показник був у 3,6 ($p<0,001$) раза вищим у порівнянні з контролем в епітелії крипт ДПК та повертався до контрольних значень за умов нормобіозу.

Ген *Tlr2* кодує Toll-like рецептор 2, що розпізнає консервативні патоген-асоційовані молекулярні патерни, які властиві великій групі мікроорганізмів, і відіграють роль у індукції вродженої та набутої імунної відповіді. За умов тривалої гіпохлоргідрії виявлено зростання відносного вмісту мРНК гена *Tlr2* у ДПК: в епітеліоцитах ворсинок – у 3,2 ($p<0,001$) раза, в епітеліоцитах крипт – у 2,6 ($p<0,001$) раза відносно контролю. При сумісному введенні препарату «Симбітер®» та омепразолу даний показник наближався до контрольних значень.

Нормалізація експресії генів *Defa* та *Tlr2* при застосуванні мультипробіотичного препарату свідчить про істотний вклад дисбіотичних порушень у розвиток ушкоджень, що відбуваються у епітеліоцитах ДПК за умов тривалої гіпохлоргідрії.

Отже, доведено зміни експресії генів у епітеліоцитах ДПК щурів за умов дисбіозу на фоні тривалого пригнічення кислотопродукуючої функції шлунка, а саме підвищення рівня експресії генів, що залучені до розвитку запалення (*Nos2, Par2)*, гіпертрофії (*Gast, Chga, Cckbr)*, регенерації (*Reg1a, Tgfb1)* та відповіді на патогенну мікрофлору (*Defa, Tlr2)* ДПК.

Таким чином, встановлено, що при тривалому гальмуванні кислотної секреції шлунка у клітинах епітелію крипт дванадцятипалої кишки щурів відмічалися ознаки більшого порушення окисно-антиоксидантної рівноваги та експресії наведеного ряду генів, ніж у епітеліоцитах ворсинок за даних умов. Це можна пояснити наявністю у складі крипт клонів низькодиференційованих проліферативних клітин, яким властива менша стійкість до окисного стресу порівняно з диференційованими постмітотичними клітинами [Barrett K., 2006]. Також відомо, що на ранніх стадіях запальних захворювань тонкої кишки в першу чергу пошкоджуються епітеліоцити крипт за рахунок міграції нейтрофілів із судин у просвіт крипт, що призводить до формування криптових абсцесів [Yamada T., 2008].

Крім того, у проведеному експериментальному дослідженні показано ключову роль дисбіозу травного тракту у ініціації пошкодження епітеліоцитів ДПК та визначено, що до біохімічних механізмів ушкодження за умов тривалого пригнічення секреції гідрохлоридної кислоти у шлунку залучається порушення окисно-антиоксидантної рівноваги та зміна експресії ряду генів епітеліальних клітин.

Результатами експериментальних досліджень встановлено біохімічний механізм розвитку пошкоджень епітеліоцитів ДПК на фоні тривалого пригнічення секреції гідрохлоридної кислоти у шлунку. Тривала гіпохлоргідрія призводить до розвитку дисбіозу у ДПК. За умов бактеріальної колонізації дванадцятипалої кишки відбувається активація Toll-like рецепторів на поверхні епітеліальних клітин та секреція α-дефензинів клітинами Панета у криптах ДПК, що узгоджується із встановленим підвищенням експресії генів *Tlr2* та *Defa* (табл. 6), внаслідок чого розвивається запальний процес. При цьому відбувається вивільнення прозапальних цитокінів, зокрема ФНП-α, ІЛ-1, ІЛ-8 та PAF на фоні зниження протизапального ІЛ-10 [Frossard J., 2012]. Вищевказані цитокіни стимулюють експресію молекул клітинної адгезії (МКА) на плазматичній мембрані нейтрофілів та ендотеліоцитів, що призводить до міграції нейтрофілів із мікроциркуляторного русла в тканини ДПК [Johnson L., 2012]. Активація нейтрофілів обумовлює подальше зростання продукування прозапальних цитокінів, зростання експресії МКА, підвищення проникності судин та генерації АФК в клітинах епітелію ДПК [Yamada T., 2008; Johnson L., 2012]. Виділення цитокінів та збільшена експресія МКА сприяють ще більшій міграції нейтрофілів, що викликає цикл запалення, наслідком чого стає потужна генерація АФК та розвиток ОС [Frossard J., 2002; Barrett K., 2006].

Таким чином, накопичення прозапальних молекул з джерела ендогенного запалення, вплив клітинних та секреторних компонентів дисбіотичної мікрофлори обумовлює стрімкий розвиток циклу запалення у тканинах ДПК, що підтверджується встановленим підвищенням експресії гена *Par2* (табл. 6), який вказує на активацію рецепторів бактеріальними протеазами та триптазами тучних клітин [Bueno L., 2008].

У наших дослідженнях встановлено зростання вмісту супероксидного аніон-радикалу, пероксиду гідрогену (табл. 1), нітрит-іонів (табл. 2), продуктів вільнорадикального окиснення ліпідів (табл. 3) та ОМБ на фоні підвищення ксантиоксидазної (табл. 1), загальної NOS-активності (табл. 2) та експресії гену *Nos2* (табл. 6), а також зниження активності ферментів першої лінії захисту (табл. 4) та глутатіон-залежної ланки АОС (табл. 5), крім того, падіння рівня відновлених тіолів, що чітко вказує на розвиток ОС. Натомість у відповідь активується експресія генів *Gast, Cckbr, Chga* (табл. 6), що залучені у розвиток гіпертрофії, та *Reg1a* і *Tgfb1* (табл. 6), що відповідають за регенеративні процеси, у клітинах епітелію ДПК щурів за умов дисбіозу на фоні тривалого пригнічення кислотопродукуючої функції шлунка.

Показано нормалізацію окисно-антиоксидантної рівноваги, а також подібну до контрольної експресію ряду досліджених генів у епітеліоцитах ворсинок та крипт ДПК щурів з гіпоацидним станом шлунка при введенні мультипробіотичного препарату. Встановлені у нашій роботі ефекти мультипробіотика "Симбітер®" обумовлюються не лише підтриманням нормобіозу ШКТ, але й імуномоделюючими, антиоксидантними властивостями препарату, у тому числі здатністю інгібувати розвиток гіпергастринемії [Ng S., 2009; Янковский Д., 2009; Фалалєєва Т, 2012].

Таким чином, отримані результати виявили наявність запального процесу у епітеліоцитах ворсинок та крипт ДПК щурів, що реалізується шляхом розвитку окисного стресу та зміною експресії ряду генів на фоні дисбіозу за умов тривалого пригнічення секреції гідрохлоридної кислоти у шлунку.

ВИСНОВКИ

1. Встановлено, що до біохімічних механізмів пошкодження епітеліоцитів дванадцятипалої кишки щурів за умов тривалого пригнічення секреції гідрохлоридної кислоти у шлунку залучається порушення окисно-антиоксидантної рівноваги та зміна експресії ряду генів.

2. Показано інтенсифікацію прооксидантних процесів, а саме зростання вмісту супероксидного аніон-радикалу, пероксиду гідрогену, нітрит-іонів, продуктів ПОЛ та ОМБ на фоні підвищення ксантиноксидазної і загальної NOS-активності в клітинах епітелію дванадцятипалої кишки щурів при тривалій гіпохлоргідрії шлунка.

3. Доведено порушення антиоксидантної системи в епітеліальних клітинах ворсинок та крипт дванадцятипалої кишки щурів на фоні тривалого пригнічення кислотопродукуючої функції шлунка, а саме зростання супероксиддисмутазної активності в 1,5 і 2,6 раза на фоні зниження каталазної активності в 1,3 і 3,4 раза, відповідно, вмісту тіолів та виснаження глутатіон-залежної ланки АОС.

4. Виявлено зміни експресії ряду генів в епітеліоцитах ворсинок та крипт дванадцятипалої кишки щурів за умов тривалого гіпоацидного стану шлунка, а саме підвищення рівня експресії генів, що залучені до розвитку запалення (*Nos2* в 2,9 і 1,5 раза, *Par2* в 1,8 і 8,2 раза, відповідно) гіпертрофії (*Gast* в 1,9 і 5,9 раза, *Chga* в 1,4 і 2 рази, *Cckbr* в 1,5 і 4 рази, відповідно), регенерації (*Reg1a* в 1,8 раза у ворсинках, *Tgfb1* у 4,1 і зниження в 1,9 раза, відповідно) та відповіді клітин на патогенну

мікрофлору (*Defa* в 3,6 раза у криптах, *Tlr2* в 3,2 і 2,6 раза, відповідно).

5. При тривалому гальмуванні кислотної секреції шлунка у клітинах епітелію крипт дванадцятипалої кишки щурів встановлено більш виражені ознаки інтенсифікації прооксидантних процесів, порушення антиоксидантної системи та експресії наведених генів, ніж у епітеліоцитах ворсинок за даних умов.

6. Виявлено, що введення мультипробіотика "Симбітер®" призводить до відновлення окисно-антиоксидантної рівноваги та експресії ряду генів в епітеліоцитах ворсинок та крипт дванадцятипалої кишки щурів за умов тривалого гіпоацидного стану шлунка.

7. Показано ключову роль дисбіотично-запального шляху у розвитку пошкоджень епітеліальних клітин дванадцятипалої кишки щурів на фоні тривалої гіпохлоргідрії шлунка, що підтверджується нормалізацією окисно-антиоксидантної рівноваги, а також подібною до контрольної експресією досліджених генів при введенні мультипробіотичного препарату.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Савко У.В. Вплив мультипробіотика Симбітер на вільнорадикальні процеси в епітеліоцитах дванадцятипалої кишки за умов тривалої шлункової гіпохлоргідрії / К.О. Дворщенко, У.В. Савко, Л.І. Остапченко // Експериментальна та клінічна фізіологія та біохімія. – 2013. – №61, Т. 1. – С. 85–90. *(Особистий внесок здобувача – проведено експериментальні дослідження та аналіз отриманих результатів).*

2. Савко У. Експресія гена *Tgfβ*1 у епітеліоцитах дванадцятипалої кишки щурів за умов тривалої гіпоацидності та при введенні мультипробіотика Симбітер / К. Дворщенко, А. Драницина, У. Савко, Л. Остапченко // Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченко. – 2013. – №16. – С. 25–28. *(Особистий внесок здобувача – проведено визначення рівня експресії генів, а також обробку отриманих результатів).*

3. Savko U. Expression of *Reg1*α gene in rat duodenal upon long-term hypoacidity and with administrtion of multiprobiotic "Symbiter® acidophilic" concentrated / A. Dranitsina, K. Dvorchshenko, U. Savko, L. Ostapchenko // Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченко. – 2013. – №64, Т. 2. – С. 5–7. *(Особистий внесок здобувача – проведено експериментальні дослідження та обробку отриманих результатів).*

4. Savko U. Expression of *Chga* gene in rat duodenal epithelial cells upon long-term gastric hypoacidity and with administration of multiprobiotic Symbiter / A. Dranitsina, U. Savko, K. Dvorchshenko, L. Ostapchenko // Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченко. – 2013. – №65, Т. 3. – С. 5–8. *(Особистий внесок здобувача – проведено експериментальні дослідження, визначення рівня експресії генів, а також аналіз отриманих результатів).*

5. Савко У.В. Действие мультипробиотического препарата на состояние глутатионовой системы эпителиоцитов двенадцатиперстной кишки при длительной

желудочной гипохлоргидрии / У.В. Савко, Е.А. Дворщенко, Л.И. Остапченко // Биофармацевтический журнал. – 2014. – №6, Т. 2. – С. 24–28. *(Особистий внесок здобувача – проведено визначення активностей глутатіон-залежних ферментів та вмісту глутатіону, здійснено обробку, аналіз даних та підготовку матеріалів до друку).*

6. Савко У.В. Перекисне окиснення ліпідів у клітинах дванадцятипалої кишки за умов тривалої гіпоацидності шлункового соку / К.О. Дворщенко, У.В. Савко, Л.І. Остапченко // Шевченківська весна 2012: X Міжнар. міждисципл. наук. конф. студ., асп. та молод. науковців, 19-23 березня 2012 р.: матер. конф. – Київ, 2012. – С. 94–95.

7. Савко У.В. Содержание SH-групп в эпителиальных клетках двенадцатиперстной кишки при длительной желудочной гипохлоргидрии / Е.А. Дворщенко, У.В. Савко, Л.И. Остапченко // Биология – наука XXI века: 16-ая Междунар. Пущинская школа-конф. молод. ученых, 16-21 апреля 2012 г.: сборник тезисов. – Пущино, 2012. – С. 411–412.

8. Савко У.В Активность антиоксидантных энзимов в эпителиальных клетках двенадцатиперстной кишки крыс при длительной желудочной гипохлоргидрии / Е.А. Дворщенко, У.В. Савко, Л.И. Остапченко // Санкт-Петербург – Гастро-2012: 14-тый Междунар. Славяно-Балтийский науч. форум, 14–16 мая 2012 г.: материалы форума. – Санкт-Петербург, 2012. – С. М24.

9. Савко У.В. Действие мультипробиотика “Симбитер® ацидофильный” концентрированный на γ-глутамилтрансферазную активность в эпителиоцитах двенадцатиперстной кишки крыс при длительном гипоацидном состоянии / Е.А. Дворщенко, У.В. Савко, Л.И. Остапченко // Актуальные проблемы биологии и химии: Всероссийская молодеж. конф., 30 июля – 3 августа 2012 г.: сборник тезисов. – Пущино, 2012. – С. 15.

10. Savko U.V. Lipid peroxidation and Tgfb1 gene expression in duodenal epithelial cells upon long-term gastric hypoacidity and treatment with multiprobiotic Symbiter / K.O. Dvorshchenko, U.V. Savko, A.S. Dranitsina, L.I. Ostapchenko // Advances in pharmacology and pathology of the digestive tract: 4th International Scientific Conference, September 26-28, 2012: abstract book. – Kiev, 2012. – P. 33.

11. Савко У.В. Окислительно-антиоксидантный баланс в эпителиоцитах двенадцатиперстной кишки при длительном гипоацидном состоянии / Е.А. Дворщенко, У.В. Савко, Л.И. Остапченко // Биология будущего: традиции и новации: II Всерос. с междунар. участ. школа-конфер. молод. ученых, 1–5 октября 2012 г.: сборник трудов. – Єкатеринбург, 2012. – С. 240–241.

12. Савко У.В. Вплив мультипробіотика “Симбітер® концентрований ацидофільний” на ксантиноксидазну активність у епітеліоцитах дванадцятипалої кишки за умов гіпоацидного стану / К.О. Дворщенко, У.В. Савко, Л.І. Остапченко // XIV конгрес світ. федер. укр. лікар. тов., 4–6 жовтня 2012 р.: матеріали конгресу. – Донецьк, 2012. – С. 175.

13. Савко У.В. Дія мультипробіотика Симбітер на вільнорадикальні процеси у клітинах дванадцятипалої кишки за умов тривалої гіпоацидності / С.В. Бабич, У.В. Савко, К.О. Дворщенко // Біологічні дослідження молодих учених в Україні:

XII Всеукр. наук. конф. студ., асп. та молод. науковців, 14–16 листопада 2012 р.: матеріали конференції. – Київ, 2012. – С. 10.

14. Savko U. Stress response of duodeno-pancreatic cells in rats with suppressed gastric acid secretion upon dysbiosis and normobiosis / S. Vakal, U. Savko, K. Dvorshchenko, T. Borodina, L. Ostapchenko // 25th Belgian Week of Gastroenterology, February 28 – March 2 2013: Acta Gastroenterologica Belgica. – Antwerp, 2013. – Vol. 76, № 1. – P. 17.

15. Савко У.В. Дія мультипробіотика Симбітер на вміст супероксидного аніон-радикалу у епітеліоцитах дванадцятипалої кишки за умов тривалої гіпоацидності / К.О. Дворщенко, У.В. Савко, Л.І. Остапченко // Журнал Національної академії медичних наук України: тези конференції молодих вчених, присвяченої 20-річчю Національної академії медичних наук України, 5 березня 2013 р. – Київ, 2013. – Т. 19. – С. 50–51.

16. Савко У. Експресія гена TGFβ1 в епітеліоцитах дванадцятипалої кишки щурів за умов тривалої гіпоацидності / А. Драницина, К. Дворщенко, У. Савко, Л. Остапченко // Шевченківська весна 2013: XI Міжнар. міждисципл. наук. конф. студ., асп. та молод. науковців, 18-22 березня 2013 р.: матер. конф. – Київ, 2013. – С. 39.

17. Савко У.В. Действие мультипробиотика “Симбитер®” на експрессию гена TGFβ1 в печени и двенадцатиперстной кишке крыс при длительной желудочной гипохлоргидрии / Е.А. Дворщенко, А.С. Драницина, О.О. Бернык, У.В. Савко, Л.И. Остапченко // Биология – наука XXI века: 17-а Междунар. Пущинская школа-конф. молод. учен., 22–26 апреля 2013г.: сборник трудов. – Пущино, 2013. – С. 267.

18. Savko U.V. Free radical processes and Reg1α gene expression in duodenal epithelial cells upon long-term gastric hypoacidity and treatment with multiprobiotic Symbiter / K.O. Dvorshchenko, U.V. Savko, A.S. Dranitsina, L.I. Ostapchenko // 7th Lviv-Lublin conference of Experimental and Clinical Biochemistry, May 23–24 2013: abstract book.– Lviv, 2013. – P. 36.

19. Savko U.V. Expression of Reg1α gene in organs of rat digestive tract upon long-term gastric hypochlorhydria / K.O. Dvorshchenko, A.S. Dranitsina, U.V. Savko, O.O. Bernyk, L.I. Ostapchenko // International Interdisciplinary Scientific Conference Biologically active substances and materials: Fundamental and Applied Problems, May 27 – June 1 2013: abstract book. – Novy Svet, 2013. – P. 119–120.

20. Savko U. Oxidative-antioxidative balance in duodenal epithelial cells upon long-term gastric hypochlorhydria and its correction with multiprobiotic “Symbiter” / K. Dvorshchenko, U. Savko, L. Ostapchenko // 21st United European Gastroenterology Week (UEGW), 12-16 October 2013: abstract book. – Berlin, 2013. – Vol. 1, № 1. – P. A249.

21. Savko U.V. Expression of *Nos2* gene in rat duodenal epithelial cells upon long-term gastric hypoacidity and treatment with multiprobiotic “Symbiter®” / U.V. Savko, A.S. Dranitsina, K.O. Dvorshchenko, L.I. Ostapchenko // Шевченківська весна 2014: XII Міжнар. міждисципл. наук. конф. студ., асп. та молод. науковців, 25-28 березня 2014 р.: матер. конф. – Київ, 2014. – С. 56–57.

22. Savko U.V. Glutathione system in duodenal epitheliocytes of rats upon hypoacidic condition / S.V. Babych, U.V. Savko, K.O. Dvorshchenko // Шевченківська весна 2014: XII Міжнар. міждисципл. наук. конф. студ., асп. та молод. науковців, 25-28 березня 2014 р.: матер. конф. – Київ, 2014. – С. 13–14.

АНОТАЦІЯ

Савко У.В. Біохімічні механізми пошкодження епітеліоцитів дванадцятипалої кишки щурів за умов тривалого пригнічення секреції гідрохлоридної кислоти у шлунку. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія. – Київський національний університет імені Тараса Шевченка МОН України, Київ, 2014.

Дисертаційна робота присвячена вивченню ролі дисбіотично-запального шляху у розвитку порушень епітеліоцитів дванадцятипалої кишки (ДПК) щурів за умов тривалого пригнічення секреції гідрохлоридної кислоти у шлунку.

У роботі оцінено інтенсивність вільнорадикальних процесів, визначено показники стану антиоксидантних систем, встановлено рівень експресії ряду генів (*Nos2, Par2, Gast, Chga, Cckbr, Reg1a, Tgfb1, Defa, Tlr2)*, залучених до розвитку запалення, гіпертрофії, регенерації та відповіді на патогенну мікрофлору клітин епітелію ворсинок та крипт ДПК щурів за умов дисбіозу та нормобіозу на фоні тривалої гіпохлоргідрії.

Результати досліджень показали, що до біохімічних механізмів пошкодження епітеліоцитів ДПК щурів за умов дисбіозу на фоні тривалої шлункової гіпохлоргідрії залучається порушення окисно-антиоксидантної рівноваги, а також зміна рівня експресії ряду генів у дуоденальних клітинах. Встановлено, що при тривалому гальмуванні кислотної секреції шлунка у клітинах епітелію крипт ДПК щурів відмічалися ознаки більшого порушення, ніж у епітеліоцитах ворсинок за даних умов. Доведено ключову роль дисбіотично-запального шляху у розвитку пошкоджень епітеліальних клітин дванадцятипалої кишки щурів на фоні тривалого пригнічення секреції гідрохлоридної кислоти у шлунку, що підтверджується нормалізацією окисно-антиоксидантної рівноваги, а також подібною до контрольної експресією ряду досліджених генів при введенні мультипробіотичного препарату.

Ключові слова: гіпохлоргідрія, дисбіоз, окисний стрес, епітеліоцити, дванадцятипала кишка.

АННОТАЦИЯ

Савко У.В. Биохимические механизмы повреждения эпителиоцитов двенадцатиперстной кишки крыс в условиях длительного подавления секреции гидрохлоридной кислоты в желудке. – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по

специальности 03.00.04 – биохимия. – Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко МОН Украины, Киев, 2014.

Диссертационная работа посвящена изучению роли дисбиотическо-воспалительного пути в развитии повреждений эпителиоцитов двенадцатиперстной кишки (ДПК) крыс в условиях длительного подавления секреции гидрохлоридной кислоты в желудке.

В работе оценена интенсивность свободнорадикальных процессов в эпителиоцитах ворсинок и крипт ДПК (ксантиноксидазная активность, накопление супероксидного аниона, содержание органических гидропероксидов, а также суммарная NO-синтазная активность, уровень нитрит-ионов, продуктов липопероксидации и окислительной модификации белков), определены показатели состояния антиоксидантных систем ДПК (супероксиддисмутазная, каталазная активности, содержание восстановленного глутатиона и активность глутатион-зависимых ферментов – глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы, глутатионтрансферазы и γ-глутамилтранспептидазы, а также содержание общих, белок-связанных и небелковых SH-групп, уровень металлотионеинов), установлен уровень экспрессии ряда генов (*Nos2, Par2, Gast, Chga, Cckbr, Reg1a, Tgfb1, Defa, Tlr2)*, вовлеченных в развитие воспаления, гипертрофии, регенерации и ответа на патогенную микрофлору клеток эпителия ДПК крыс в условиях дисбиоза и нормобиоза на фоне длительной гипохлоргидрии.

Результаты исследований показали, что в биохимические механизмы повреждения эпителиоцитов ДПК крыс в условиях дисбиоза на фоне длительной желудочной гипохлоргидрии вовлекается нарушение окислительно-антиоксидантного равновесия, а также изменение уровня экспрессии ряда генов в дуоденальных клетках. Установлено, что при длительном торможении кислотной секреции желудка в клетках эпителия крипт ДПК крыс отмечались признаки большего повреждения, чем в эпителиоцитах ворсинок при данных условиях. Доказано весомую роль дисбиотическо-воспалительного пути в развитии повреждений эпителиальных клеток двенадцатиперстной кишки крыс на фоне длительного подавления секреции гидрохлоридной кислоты в желудке, что подтверждается нормализацией окислительно-антиоксидантного равновесия, а также подобной контрольной экспрессией ряда исследованных генов при введении мультипробиотического препарата.

Ключевые слова: гипохлоргидрия, дисбиоз, окислительный стресс, эпителиоциты, двенадцатиперстная кишка.

ANNOTATION

Savko U.V. Biochemical mechanisms of rat duodenal epitheliocytes damage upon long-term suppression of gastric hydrochloric acid secretion . – Manuscript.

The thesis for obtaining the Candidate degree of Biological Sciences on the speciality 03.00.04 – biochemistry. – Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ministry of

Education and Science of Ukraine, Kyiv, 2014.

The thesis deals with the study of dysbiotic-inflammatory pathway role in damage of rat duodenal epitheliocytes upon long-term suppression of gastric hydrochloric acid secretion.

The following parameters were determined in the study: intensity of free-radical processes, indices of duodenum antioxidative system state, expression level of few genes involved in development of inflammation, hypertrophy, regeneration and response to pathogenic microbiota of duodenal epitheliocytes upon dysbiosis and normobiosis in rats with chronically suppressed gastric acid secretion.

Results of performed investigations indicate that following biochemical mechanisms are involved in duodenal cells damage upon selected experimental conditions: violation of prooxidative/antioxidative balance and shift in expression pattern of few studied genes in duodenal cells. It was elucidated that damage level in crypt epithelial cells was higher in comparison with villus epithelial cells of rats with chronically suppressed gastric acid secretion. The leading role of dysbiotic-inflammatory pathway in damage of rat duodenal epitheliocytes upon long-term suppression of gastric hydrochloric acid secretion was established.

Key words: hypochlorhydria, dysbiosis, oxidative stress, epitheliocytes, duodenum.