

УДК 616.34-002-02-092+616.833

А. Присяжнюк, асп., К. Нестерук, студ.,
Т. Червінська, канд. біол. наук, Г. Толстанова, д-р біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ

ЕКСПРЕСІЯ ТА ЛОКАЛІЗАЦІЯ Д₃-ДОФАМІНОВИХ РЕЦЕПТОРІВ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ВИРАЗКОВОГО КОЛІТУ

Встановлено, що за нормальних умов Д₃-дофамінові рецептори локалізовані на епітеліальних, ендотеліальних клітинах та ентеральних нейронах слизової оболонки товстої кишки щурів. За розвитку запалення товстої кишки, при експериментальному виразковому коліті, рівень експресії Д₃-рецепторів зменшується, а їх основним джерелом є поверхневі колоноцити.

Ключові слова: Д₃-дофамінові рецептори, експериментальний виразковий коліт, дофамін.

Вступ. За останні десять років, що підтверджується експертним оцінюванням Всесвітньої організації охорони здоров'я, простежується чітка тенденція до збільшення захворюваності на запальні захворювання кишечника (ЗЗК), до яких належать виразковий коліт та хвороба Крона [6, 10]. Серед осіб, які хворіють на ЗЗК, приблизно 50% складають особи працездатного віку, що підтверджує соціальну значимість даної патології, яка нерідко призводить до інвалідності. Хворі на ЗЗК потребують госпіталізації, тож стають непрацездатними на період від 10 до 14 днів, а в деяких випадках і більше.

Порушення функціонування дофамінергічної нервової системи викликає ряд патологічних станів, серед яких: шизофренія, хвороба Паркінсона, біполярні порушення, депресії, синдром неспокійних ніг, гіперпролактинемія, пухлини гіпофізу, гіпертензія, гастропарез, нудота та еректильна дисфункція [1; 5], тому і широко розповсюдженими в медичній фармакології є агоністи та антагоністи дофамінових рецепторів. Дофамін опосередковує свій ефект через два класи дофамінових рецепторів D₁- до яких належать D₁ і D₅-підтипи та D₂ – до яких належать D₂, D₃ та D₄-підтипи [1]. Експресію дофамінових рецепторів D₁, D₂, D₃ та D₅-підтипу виявлено в слизовій оболонці як верхніх (шлунок), так і нижніх (тонкій та товстій кишках) відділів шлунково-кишкового тракту (ШКТ) [7].

На сьогоднішній день існують прямі та опосередковані докази, що порушення у дофамінергічній системі можуть впливати на перебіг ЗЗК. Нами показано, що хворі на шизофренію, яка характеризується гіпердофамінергічною активністю, не схильні до ЗЗК [8]. А при хворобі Паркінсона, яка характеризується зниженою дофамінергічною активністю, навпаки, спостерігається підвищений ризик захворюваності на дану патологію [3]. В наших попередніх дослідженнях встановлено зміни експресії D₂-рецепторів в слизовій оболонці товстої кишки пацієнтів з ЗЗК та при експериментальному коліті [4; 9]. Активність D₂-рецепторів прискорювала загоєння уражень при експериментальному коліті за рахунок пригнічення ендотеліальної проникності і, як наслідок, зменшення запалення [9]. D₃-рецептори, також належать до D₂-класу дофамінових рецепторів, які пригнічують аденілатциклазу активність. За норми, D₃-рецептори можуть локалізуватися як на пре-, так і на постсинаптичній мембрані дофамінергічних нейронів, гени, кодуєчі D₃-рецептори, були знайдені як в нервово-м'язовому плетиві, так і в слизовій оболонці товстої кишки [5], що може вказувати на потужну роль D₃-рецепторів у функціонуванні ШКТ. Метою даної роботи, була перевірка гіпотези про залучення D₃-рецепторів у патогенез ЗЗК.

Матеріали і методи. В експерименті були використані щури лінії Вістар масою 170-220 г, що утримувалися на стандартному раціоні віварію. Виразковий коліт викликали загальноприйнятим методом (після дефека-

ції щурам ректально вводили 0,1 мл 6% йодоацетаміду, розведеного в 1% розчині метилцелюлози) [8]. Щури піддавалися аутопсії шляхом цервікальної дислокації через 0,5, 2, 6 годин та 3, 7 та 14 днів від моменту викликання виразкового коліту. Під час аутопсії було видалено 7 см товстої кишки, яка була розрізана вздовж з протилежної від мезентерію боку та промита в холодному натрій-фосфатному буфері. Після чого у частини групи була зібрана слизова оболонка товстої кишки та занурена в рідкий азот для збереження нативної структури білків для наступного аналізу вмісту протеїнів методикою Вестерн блот, а у другій частини зразки товстої кишки були використані для імуногістохімічного аналізу. Ізольовану ділянку кишки гомогенізували за допомогою DOUNCE гомогенізатора (Sigma, США) у лізуючому розчині (0,1% SDS, 1% Triton X-100, 2 мкМ PMSF, 1 мкМ ортованадату натрія). Зразки були заіольовані в лізис-буфері, що містив інгібітори протеаз та фосфатаз. Загальну концентрацію білків визначали за методом Бредфорда з використанням набору Bio-Rad для білкового аналізу (Bio-Rad, США) [2].

Розділення та визначення білка (100 мкг заг. білку/зразок) методом Вестерн блоту проводили у 8% SDS поліакриламідному гелі з наступним переносом на Hybond-ECL нітроцелюлозну мембрану (Amersham Biosciences, США) згідно зі стандартним протоколом фірми Bio-Rad. Зразки перед нанесенням у гель інкубували при температурі 95°C протягом 5 хв. Антитіла проти D₃-рецептора (1:250) (Santa Cruz Biotechnology Inc., Німеччина) та бета-актину (1:500); використовували для визначення рівня експресії білків у слизовій оболонці товстої кишки, с наступною інкубацією зі анти-кролячими (анти-D₃ рецептор) та анти-мишачими (анти-бета-актин) вторинними антитілами (1:2500), відповідно, кон'югованим з пероксидазою хрому. Візуалізацію Вестерн-блот проводили ECL-реагентом. Результати не менш, ніж трьох різних експериментів були проаналізовані за допомогою програми Phoretix1D. Рівень експресії досліджуваного білку визначали за числом умовних одиниць флуоресцентного сигналу (у.о.), використовуючи у.о. флуоресцентного сигналу білку бета-актину для стандартизації вихідної кількості білку. Зміни експресії вираховували за різницею числа у.о. флуоресцентного сигналу експериментальної групи до контрольної. Кожен Вестерн блот був повторений двічі.

Імунофарбування: були використані занурені у парафін фрагменти кишки товщиною 5 мкм. Фрагменти були депарафінізовані, гідратовані, заблоковані за допомогою 3% H₂O₂/H₂O та оброблені антиген-вивільнюючим розчином Dako (pH 10.0). Після чого зразки інкубувалися впродовж 12 год. при 4°C з первинними кролячими анти-D₃ рецептор антитілами (1:100), з подальшим біотинілюванням вторинними антитілами та маркуванням стрептавідин-біотин пероксидазою. Далі

зразки були пофарбовані і проявлені за допомогою методу АВС детекції та оцінені за допомогою мікроскопу (Nikon, Японія). Для підтвердження специфічності анти-тіл як контроль застосовували імуноабсорбцію антитіл.

Статистичний аналіз даних проводили з використанням програми Statistica 8.0. Для кожної з вибірок перевіряли чи є нормальним розподіл досліджуваного показника, застосовуючи критерій Шапіро-Вілка. Для

порівняння вибірок підраховували середнє арифметичне та похибку середнього арифметичного. Достовірність різниці між порівнюваними групами оцінювали за допомогою t-критерію Стьюдента. Статистично значущою для всіх показників вважали різницю $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення.

За допомогою Вестерн блот аналізу нами були встановлені зміни експресії Д3-рецепторів (Рис. 1).

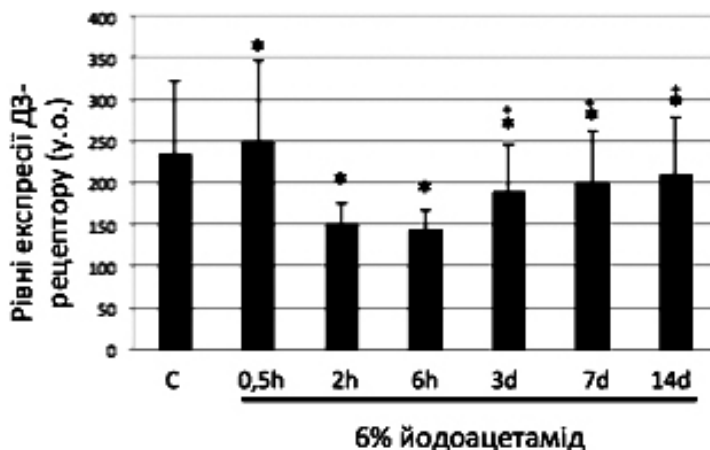


Рис. 1. Рівень експресії Д3 рецепторів у стінці товстої кишки щурів на фоні дії йодоацетамід-викликаного експериментального коліту різних термінів за результатами Вестерн-блот аналізу. $M \pm SD$, * – $p < 0,05$ відносно контролю (C). + – $p < 0,05$ відносно 2h та 6h.

Як видно з рисунку 1, експресія Д3-рецепторів зменшувалась ($p < 0,05$) вже через 2 години після введення ЙА, досягала мінімальних значень через 6 годин, підвищувалась через 3, 7 та 14 днів, але так і не досягала контрольних значень.

Як показано в наших попередніх дослідженнях [9], найбільших значень індекс активності захворювання досягає на 3-5 день після введення ЙА. При цьому, спостерігається збільшення експресії протеїну Д2-рецепторів, починаючи з 2 годин, після введення ЙА [9], що має протилежний ефект, порівняно зі зменшенням експресії протеїну Д3-рецепторів. Але, цікаво те, що Д2-рецептори майже не експресувалися в неуразеній слизовій оболонці товстої кишки, у той час, як Д3-рецептори знайдені в значній кількості і в слизовій оболонці тварин контрольної групи (МС) (Рис. 1). Що разом з даними по експресії Д3-рецепторів, вказує на різну роль дофамінових рецепторів у функціонуванні слизової оболонки товстої кишки, а також, протіканні ЙА-викликаного коліту.

За результатами проведеного нами імуногістохімічного дослідження було встановлено, що локалізація Д3-рецепторів відрізняється в нормі та на різних стадіях перебігу запалення при йодоацетамід-індукованому експериментальному виразковому коліту. У контрольній групі (МС) спостерігалася переважно епітеліальна локалізація Д3-рецепторів, причому, вони рівномірно розміщені по всій поверхні крипт (з основи до верхівки) на апікальних та базолатеральних мембранах епітеліоцитів та келихоподібних клітин. У той час, як на фоні 7 діб після введення ЙА спостерігалася помітне збільшення експресії Д3-рецепторів в м'язовій частині слизової оболонки товстої кишки та їх локалізація зсунулася ближче до верхівки крипт на апікальну мембрану епітеліоцитів, а експресія Д3-рецепторів на келихоподібних клітинах помітно зменшилася.

За літературними даними, гени, що кодують Д3-дофамінові рецептори (як і інші рецептори даної групи, окрім Д4) виявлені по всій довжині травного тракту, починаючи від шлунка, закінчуючи товстою кишкою. При цьому, транскрипти до Д3-рецепторів знайдені в слизовій оболонці і в нервово-м'язовому плетиві [6]. Це вказує на те, що дофамін може опосередковувати свою дію через Д3-рецептори у ШКТ. Але яку саме роль відіграє даний тип рецептора, залишається невідомим. Зміна локалізації Д3-рецепторів на переважно епітеліальну на поверхні крипт на фоні розвитку запалення на фоні ЙА-викликаного коліту, вказує на можливість захисну роль даних рецепторів. У будь-якому разі, дана гіпотеза потребує подальших досліджень та експериментального доведення.

Висновки. Було встановлено, що за нормальних умов Д3-рецептори локалізовані на епітеліальних, ендотеліальних клітинах та ентеральних нейронах слизової оболонки товстої кишки щурів. Вперше встановлено, що за умов розвитку експериментального коліту спостерігається зменшення рівня протеїну Д3-рецепторів. При цьому вони локалізовані переважно на поверхневих колоноцитах, що може вказувати на захисну роль даного типу дофамінових рецепторів в патогенезі ЗЗК.

Список використаних джерел

1. Beaulieu J.M. The physiology, signaling and pharmacology of dopamine receptors / J.M. Beaulieu, R.R. Gainetdinov // *Pharmacology Review*. – 2011. – Vol. 63. – №1. – P. 182-217.
2. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M.M. Bradford // *Analytical Biochemistry*. -1976. – T. 72. – № 1. – С. 248-254.
3. Devos D. Colonic inflammation in Parkinson's disease / D. Devos, T. Leboviev, B. Lardeux [et al.] // *Neurobiology Disease*. – 2013. – Vol. 50. – P. 42-48.
4. Kernychnyi V. Impaired peripheral dopaminergic system in patients with ulcerative colitis / V. Kernychnyi, N. Dziubenko, A. Prysiazhniuk [et al.] // *The FASEB Journal*. -2015. – Vol. 29. – №1. – Suppl. LB544.

5. Li Z.S. Physiological Modulation of Intestinal Motility by Enteric Dopaminergic Neurons and the D₂Receptor: Analysis of Dopamine Receptor Expression, Location, Development, and Function in Wild-Type and Knock-Out Mice / Z.S. Li, C. Schmauss, A. Cuenca [et al.] // *The Journal of Neuroscience*. – 2006. – Vol. 26. – №10. – P. 2798-2807.

6. Mizoguchi A. Inflammatory bowel disease, past, present and future: lessons from animal models / A. Mizoguchi, E. Mizoguchi // *Journal Gastroenterology*. – 2008. – Vol. 43. – №1. – P. 1-17.

7. Satoh H. New ulcerative colitis model induced by SH blockers in rats and the effects of anti-inflammatory drugs on the colitis / H. Satoh, F. Sato, K. Takami [et al.] // *Japan Journal Pharmacology*. – 1997. – Vol. 73. – P. 299-309.

8. Tolstanova G. New molecular mechanisms of the unexpectedly complex role of VEGF in ulcerative colitis / G. Tolstanova, T. Khomenko, X. Deng [et al.] // *Journal Gastroenterology*. – 2010. – Vol. 138. – №5. – S-264.

9. Tolstanova G. Role of Dopamine and D₂ Dopamine Receptor in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease / G. Tolstanova, X. Deng, A. Ahluwalia [et al.] // *Digestive Disease Science*. – 2015. – Vol. 60. – №10. – P. 2963-2975.

10. Xavier R.J. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease / R.J. Xavier, D.K. Podolsky // *Nature*. – 2007. – Vol. 448. – №7152. – P. 427-434.

Надійшла до редколегії 02.12.15

А. Присяжнюк, асп., К. Нестерук, студ., Т. Червинская, канд. биол. наук, А. Толстанова, д-р биол. наук
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

ЭКСПРЕССИЯ И ЛОКАЛИЗАЦИЯ D₃-ДОФАМИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ НА ФОНЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ЯЗВЕННОГО КОЛИТА

Было показано, что при нормальных условиях D₃-дофаминовые рецепторы расположены на эпителиальных, эндотелиальных клетках, а также энтеральных нейронах слизистой оболочки толстого кишечника крыс. Про воспалительном процессе толстого кишечника на фоне экспериментального язвенного колита уровень экспрессии D₃-рецепторов уменьшался, а их основным источником выступали поверхностные колонocyты.

Ключевые слова: D₃- дофаминовые рецепторы, экспериментальный язвенный колит, дофамин.

A. Prysiazhniuk, PhD stud, K. Nesteruk, stud, T. Chervinska, PhD, G. Tolstanova, DSc
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv

D₃R LOCALIZATION AND EXPRESSION LEVELS DURING THE EXPERIMENTAL ULCERATIVE COLITIS

It was observed that in healthy colon D₃ receptors are mainly localized on epithelial, endothelial cells and enteric neurons of rat's colon mucosa. During the development of inflammation in colon, in experimental ulcerative colitis, the D₃ expression levels decreased and its expression was observed mostly on surface colonocytes.

Key words: D₃R, experimental ulcerative colitis, dopamine.

УДК 579.66

Л. Авдєєва, д-р мед. наук, М. Хархота, канд. биол. наук, Г. Хархота, пров. інж.
Інститут мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України, Київ

СКРИНІНГ БАКТЕРІЙ РОДУ *BACILLUS* ПРОДУЦЕНТІВ ЕКЗОПОЛІМЕРНИХ РЕЧОВИН З ФЛОКУЛЮЮЧОЮ АКТИВНІСТЮ

Серед 400 штамів бактерій роду *Bacillus* проведено скринінг продуцентів екзополімерних сполук з флокулюючими властивостями. Встановлено, що з усіх досліджених штамів баціл 40,9 % та 14,0 % продукують екзополімери полісахаридної та поліаміної природи відповідно, при культивуванні на агаризованих поживних середовищах. З найбільшою частотою продуценти полісахаридних та поліаміних речовин виділялись серед ґрунтових штамів баціл – 55,34 та 47% від усіх активних штамів відповідно. Для подальших досліджень відібрано перспективні штами, флокулююча активність екзополімерів яких складала 75-78 %.

Ключові слова: бактерії роду *Bacillus*, скринінг, біофлокулянти, екзополісахариди, поліаміни.

Вступ. На сьогодні, через антропогенний вплив на довкілля, значною проблемою стало забруднення водних ресурсів [1, 2]. В промисловості для очистки води використовують флокулянти неорганічної та органічної природи. Проте неорганічні флокулянти, а саме сполуки алюмінію, можуть викликати хворобу Альцгеймера та дитячу слабоумість, органічні – синтетичні похідні поліакриламідів – важко розкладаються в природі, а їх мономери мають нейротоксичну та канцерогенну дію [1]. Біофлокулянти (БФ), на відміну від останніх, безпечні для людей, тварин та навколишнього середовища, біодеградабельні [3].

Відомо, що БФ різної хімічної будови синтезуються стрептоміцетами, простішими, грампозитивними та грампозитивними мікроорганізмами. Деякі з них продукують екзополімери лише полісахаридної будови (*Klebsiella mobilis*), інші – полісахарид-білкові комплекси (*Nannocystis* sp. NU-2, *Aspergillus parasiticus*). Незважаючи на значну кількість досліджень, присвячених вивченню флокулюючої здатності мікробних біополімерів, існує всього декілька повідомлень про промислове виробництво і практичне використання білкових флокулянтів з *Rhodococcus erythropolis* S-1 [6] і *Bacillus* sp DP-152 [7]. У першу чергу, це пов'язано з тим, що деякі штами-продуценти, такі як *K. pneumoniae*, *Proteus*

mirabilis, *A. parasiticus* та інші можуть бути патогенними для людини, а синтезовані ними БФ мають більш високу собівартість, порівняно з неорганічними та органічними синтетичними флокулянтами.

Тому актуальним є пошук штамів-продуцентів високоефективних БФ, що можуть мати промислове значення. У зв'язку з цим особливу увагу привертють грампозитивні бактерії роду *Bacillus*, оскільки ці мікроорганізми не вибагливі до ростових субстратів, непатогенні, мають високу швидкість росту, що дозволяє використовувати їх у біотехнологічних процесах отримання БФ для очистки води. Також на сьогодні недостатньо досліджено механізми флокуляції речовин з розчинів бактеріальними екзополімерами, закономірності їх біосинтезу тощо.

Метою нашої роботи було проведення скринінгу штамів баціл продуцентів екзополімерних речовин з флокулюючою активністю

Матеріали та методи роботи. Об'єктами дослідження були 400 штамів бактерій роду *Bacillus*, що виділені з різних екологічних місць: вода (n = 63), ґрунти (n = 235), шлунково-кишковий тракт тварин та птахів (n = 52) та колекційні штами (n = 53). Штами отримані з колекції відділу антибіотиків Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України.