

ВПЛИВ МУЛЬТИПРОБІОТИКА "СИМБІТЕР АЦИДОФІЛЬНИЙ КОНЦЕНТРОВАНИЙ" НА СТАН ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕННЯ ЛІПІДІВ В ПЛАЗМІ ЩУРІВ ЗА УМОВ СТРЕС-ІНДУКОВАНОГО ВИРАЗКОУТВОРЕННЯ

**О.В. Вірченко, Т.М. Фалалеева, Т.В. Берсгова,
К.О. Дворченко, Д.С. Янковський**

Київський національний університет ім.Тараса Шевченка

Вступ

Стрес, різної сили та тривалості, посилює процеси ліпопероксидації в тканинах організму. Так, Yoshikawa, et al. (1988) повідомили, що після холодового водно-імобілізаційного стресу (ВІС) зростає концентрація ТБК-активних продуктів в СОШ [1]. Shian, et al. (1995) показали збільшення рівня гідропероксидів фосфатидилхоліну в СОШ під час ВІС [2]. Liu, et al. виявили зростання малонового діальдегіду (МДА) у плазмі щурів після імобілізаційного стресу [3]. Утворення активних форм кисню (АФК) пов'язане насамперед з порушенням мікроциркуляції, ішемією та реперфузією в слизовій [4]. В ураженій СОШ спостерігається інфільтрація нейтрофілів, які продукують супероксидний аніон, який, реагуючи з клітинними ліпідами, призводить до утворення реактивних коротколанцюгових альдегідів, таких як МДА і 4-гідроксинафтал. Пошкоджені еритроцити вивільняють гем, який також є прооксидантом. Таким чином, посилення перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) в результаті дії стресу призводить до ще більшого ураження СОШ і обтяжує гоєння виразок та ерозій [5].

Використання антибіотиків для лікування *Helicobacter pylori* асоційованих хвороб шлунка зумовило включення у схему лікування виразкової хвороби пробіотиків. Численними роботами була показана доцільність використання пробіотиків у лікуванні різноманітних гастроентерологічних хвороб, що стало

поштовхом до пошуку механізмів дії цих препаратів [6]. Були встановлені антиоксидантні властивості пробіотиків. Так, Osman et al. (2006) показали, що 2 штами *Bifidobacterium infantis* DSM 15158 і DSM 15159 значущо знижують вміст малонового діальдегіду в кишечнику щурів, хворих на коліт [7]. Park et al. (2006) повідомили про здатність *Bifidobacterium polyfermenticus* підвищувати антиоксидантний потенціал плазми крові і знижувати продукцію дієнових кон'югатів в крові щурів з 1,2-диметилгідразин-індукованим канцерогенезом в кишечнику [8]. Lutgendorff et al. (2008) виявили, що пробіотики (6 штамів бактерій родів *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Bifidobacterium*) зменшують оксидативний стрес у щурів з експериментальним гострим панкреатитом і підвищують синтез глутатіону у тканині підшлункової залози та плазмі крові [9].

Таким чином, зазначені вище антиоксидантні властивості пробіотиків можуть бути одним з механізмів позитивного впливу їх на гоєння уражень СОШ. Проте вплив цих препаратів на перекисне окислення ліпідів за умов стрес-індукованого ураження СОШ не достатньо вивчений. Тому метою роботи було з'ясувати вплив мультипробіотика нового покоління "Симбітер® ацидофільний" концентрований (НВК "О.Д. Пролісок") на ПОЛ та стан антиоксидантної системи (АОС) в плазмі крові щурів, підданих ВІС. Вибір пробіотика був обумовлений рядом його переваг: полікомпонентний склад, антибіотикорезистентні пробіотичні бактерії, які знаходяться у мутуалістичній взаємодії, рідка форма пробіотика, що забезпечує його високу активність. Також був показаний гарний вплив даного препарату на гоєння стрес-індукованих уражень СОШ [10].

Зв'язок роботи з науковими планами, темами. Робота виконана в рамках науково-дослідної теми "Дослідження механізмів функціонування органів травного тракту та розробка методів їх корекції" (№ держреєстрації 0106U005755) Київського національного університету імені Тараса Шевченка як складової комплексної державної наукової програми "Здоров'я людини".

Матеріали та методи дослідження

Дослідження проводилися на 90 білих нелінійних щурах масою 180 - 200 г з дотриманням міжнародних принципів Європейської

конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей [11]. Для утворення уражень СОШ щурів була використана модель 3-годинного водно-імобілізаційного стресу (ВІС) за Takagi et al., 1964 [12]. Тварини були поділені на 9 груп по 10 щурів в кожній:

- 1 - контрольна (інтактні щури);
- 2 - щури, яким вводили воду (0,5 мл) двічі на добу (per os), забір крові здійснювали через 24 години, слугували контролем для 3 групи;
- 3 - щури, яким вводили водний розчин Симбітеру (0,5 мл) з розрахунку 0,14 мл/кг нерозведеного препарату двічі на добу (per os), забір крові здійснювали через 24 години;
- 4 - щури, яким вводили воду, забір крові здійснювали через 48 годин, слугували контролем для 5 групи;
- 5 - щури, яким вводили Симбітер, забір крові здійснювали через 48 годин;
- 6 - щури, яким вводили воду, забір крові здійснювали через 72 години, слугували контролем для 7 групи;
- 7 - щури, яким вводили Симбітер, забір крові здійснювали через 72 години;
- 8 - щури, яким вводили воду, забір крові здійснювали через 96 годин, слугували контролем для 9 групи;
- 9 - щури, яким вводили Симбітер, забір крові здійснювали через 96 годин.

Кров збирали в пробірки, центрифугували 20 хв при +4 °С (1000 g), після чого здійснювали відбір плазми. В плазмі крові щурів визначали концентрацію білка за методом Лоурі, вміст продуктів ПОЛ: дієнових кон'югатів спектрофотометричним методом [13], ТБК-активних продуктів по реакції з тіабарбітуровою кислотою [14], шифових основ флюорометричним методом [15], визначали ферментативну активність супероксиддисмутази (СОД) [16] та каталази [17].

Статистична обробка даних здійснювалася у пакеті програм "Statistica 6.0". Для аналізу виду розподілу даних був використаний W критерій Шапіро-Уїлка. Отримані дані підлягали нормальному розподілу, тому були використані параметричні методи порівняння вибірок. Для статистичної обробки параметрич-

них даних був використаний критерій Левана, для оцінки рівності дисперсій, і t-критерій Стьюдента для незалежних вибірок. Розраховували середнє значення (M) і стандартну похибку середнього (m). Значущими вважали відмінності при $p < 0,05$.

Отримані результати та їх обговорення

Концентрація дієнових кон'югатів (ДК), первинних продуктів ПОЛ, у контролі складала $25,2 \pm 4,19$ нмоль/мг білка. Під дією стресу вміст ДК у плазмі крові значущо збільшився порівняно з контролем в 3,7; 2,6; 3; 3,4 рази у 1-ий, 2-ий, 3-ий та 4-ий дні після ВІС відповідно. Введення Симбітера зумовило статистично значуще зменшення вмісту ДК порівняно з групою щурів, підданих дії ВІС, та отримуваних плацебо на 2 день на 31,8% ($p < 0,05$) і на 4 день на 43,3% ($p < 0,01$) (рис 1).

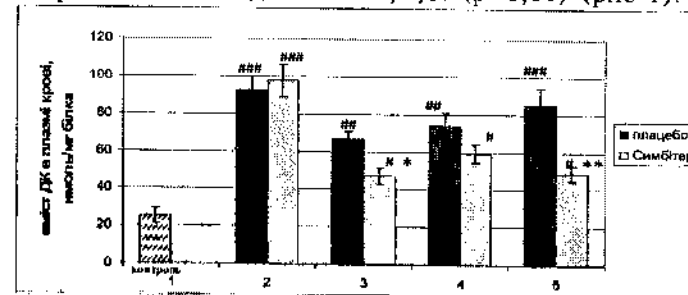


Рис.1. Вплив мультипробіотика "Симбітер" (0,14 мл/кг) на концентрацію дієнових кон'югатів в плазмі крові щурів після ВІС ($M \pm m$): 1 - контроль (інтактні щури) ($n=10$); 2 - через добу після стресу ($n=20$); 3 - через 2 доби після стресу ($n=20$); 4 - через 3 доби після стресу ($n=20$); 5 - через 4 доби після стресу ($n=20$).

Примітка: ** - $p < 0,05$, * - $p < 0,01$ відносно групи щурів, яким вводили плацебо такий самий термін, # - $p < 0,05$, ## - $p < 0,01$, ### - $p < 0,001$ відносно контролю.

Визначення вмісту вторинних продуктів ПОЛ у плазмі крові - ТБК-активних продуктів показало, що у контролі вміст їх становив $6,15 \pm 0,95$ нмоль/мг білка. 3-годинний ВІС зумовив значуще зростання рівня ТБК-активних продуктів у плазмі крові порівняно з контролем. Таке зростання було виявлене впродовж усіх чотирьох днів після ВІС. Введення Симбітера зумовило статистично значуще зниження рівня ТБК-активних продуктів в перший день після ВІС на 44% і на третю добу на 34,6%, порівняно

з групою щурів, яким вводили плацебо. При цьому вміст ТБК-активних продуктів значущо не відрізнявся від вмісту у інтактних щурів через 1 та через 3 доби після ВІС (рис.2).

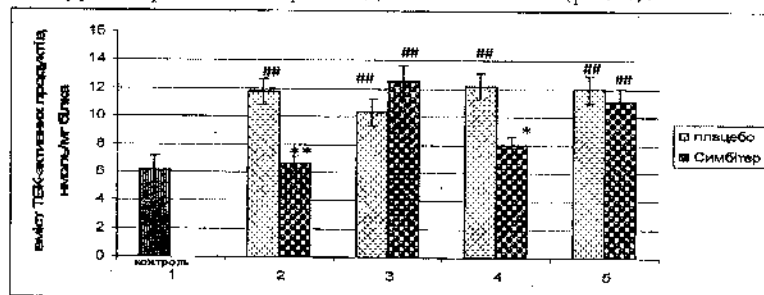


Рис.2. Вплив мультипробіотика "Симбітер" (0,14 мл/кг) на концентрацію ТБК-активних сполук в плазмі крові щурів після ВІС ($M \pm m$): 1 - контроль (інтактні щури) ($n=10$); 2 - через добу після стресу ($n=20$); 3 - через 2 доби після стресу ($n=20$); 4 - через 3 доби після стресу ($n=20$); 5 - через 4 доби після стресу ($n=20$).

Примітка: * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$ відносно групи щурів, яким вводили плацебо такий самий термін, ## - $p < 0,01$ відносно контролю.

Визначення вмісту шифових основ (ШО), кінцевих продуктів ПОЛ, показало, що у контролі він становив $0,73 \pm 0,05$ у.о./мг білка. При дії стресового фактору концентрація шифових основ значущо зростала порівняно з контролем, починаючи з 2 доби. Так, вміст ШО у групах щурів, яким вводили воду, був значущо більший в 2,9; 2,2; 3,8 рази за показники контрольної групи відповідно через 2, 3 та 4 доби після ВІС.

У щурів, які отримували мультипробіотик, рівень ШО не відрізнявся від такого у інтактних щурів. При цьому спостерігалися значущі відмінності на 2-4 добу між групами щурів, які отримували плацебо і які отримували Симбітер. Рівень ШО у групі з Симбітером виявився значущо меншим порівняно з групою щурів, які отримували плацебо, відповідно на 51,3%, 44,7% і 47,6% через 2, 3, 4 доби після ВІС (рис.3).

Що стосується ферментативної активності антиоксидантних ферментів, то активність супероксиддисмутази (СОД) у інтактних щурів становила $0,12 \pm 0,01$ у.о./мг білка за 1 хв, а каталази - $0,53 \pm 0,14$ нмоль H_2O_2 /мг білка за 1 хв. Активність супероксиддисмутази статистично значущо не змінилася, лише на другу добу

у групі щурів, які отримували плацебо, показник активності СОД був значущо більшим за контрольні показники в 1,65 рази. При цьому у групі щурів, які отримували Симбітер, цей показник не відрізнявся від значення активності фермента в контролі (рис.4).

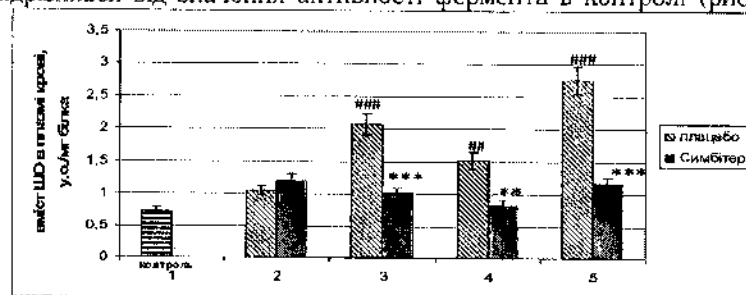


Рис.3. Вплив мультипробіотика "Симбітер" (0,14 мл/кг) на концентрацію шифових основ в плазмі крові щурів після ВІС ($M \pm m$): 1 - контроль (інтактні щури) ($n=10$); 2 - через добу після стресу ($n=20$); 3 - через 2 доби після стресу ($n=20$); 4 - через 3 доби після стресу ($n=20$); 5 - через 4 доби після стресу ($n=20$).

Примітка: ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,001$ відносно групи щурів, яким вводили плацебо такий самий термін, ## - $p < 0,01$, ### - $p < 0,001$ відносно контролю.

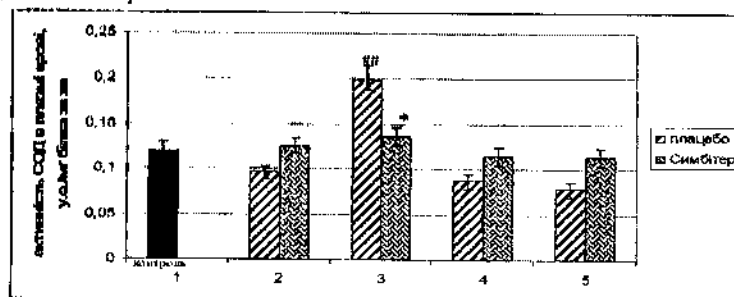


Рис.4. Вплив мультипробіотика "Симбітер" (0,14 мл/кг) на активність супероксиддисмутази в плазмі крові щурів після ВІС ($M \pm m$): 1 - контроль (інтактні щури) ($n=10$); 2 - через добу після стресу ($n=20$); 3 - через 2 доби після стресу ($n=20$); 4 - через 3 доби після стресу ($n=20$); 5 - через 4 доби після стресу ($n=20$).

Примітка: * - $p < 0,05$ відносно групи щурів, яким вводили плацебо такий самий термін, ## - $p < 0,01$ відносно контролю.

Активність каталази значно зросла після ВІС, що свідчить про утворення великої кількості її субстрату - перекису водню, хоча на 3 добу не спостерігалось значущих відмінностей по-

рівняно з контрольною групою. Введення мультипробіотика "Симбітер" зумовило зниження активності ферменту на 3-ю і 4-у добу порівняно з групою, що отримувала плацебо, відповідно на 38,5% і 25% (рис.5).

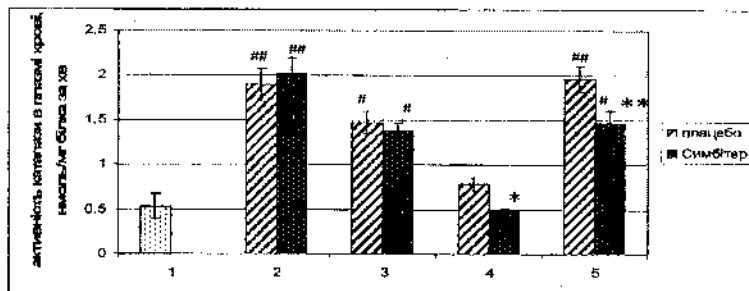


Рис. 5. Вплив мультипробіотика "Симбітер" (0,14 мл/кг) на активність каталази в плазмі крові щурів після ВІС ($M \pm m$): 1 - контроль (інтактні щури) ($n=10$); 2 - через добу після стресу ($n=20$); 3 - через 2 доби після стресу ($n=20$); 4 - через 3 доби після стресу ($n=20$); 5 - через 4 доби після стресу ($n=20$).

Примітка: * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$ відносно групи щурів, яким вводили плацебо такий самий термін, # - $p < 0,05$, ## - $p < 0,01$ відносно контролю.

Отже, аналіз отриманих результатів свідчить про те, що стрес викликав зсув окисно-антиоксидантної рівноваги у бік активації вільнорадикальних процесів. При цьому спостерігалося зростання вмісту продуктів ПОЛ та компенсаторна реакція підвищення активності ферментів антиоксидантного захисту клітин СОШ: СОД та каталази. Введення мультипробіотика "Симбітер ацидофільний" сприяло суттєвому зниженню перекисного окислення ліпідів. Вплив на антиоксидантну систему, а саме на активність каталази і супероксиддисмутази, не такий суттєвий, що може свідчити про те, що основний вплив пробіотиків на рівень ПОЛ в тканинах здійснюється через інші антиоксидантні системи. Аналіз даних літератури свідчить, що механізмом антиоксидантного захисту пробіотиків є вплив на активність глутатіонової антиоксидантної системи [9].

Зниження ПОЛ під впливом мультипробіотика "Симбітер ацидофільний" корелювало з гоєнням стрес-індукованих виразково-ерозійних уражень в СОШ, що було продемонстроване в нашому попередньому дослідженні [10].

Висновки

1. Мультипробіотик "Симбітер ацидофільний" концентрований зменшував стрес-індуковане перекисне окислення ліпідів в плазмі крові.

2. Антиоксидантні властивості Симбітеру є одним з механізмів позитивного впливу на гоєння стрес-індукованих уражень в СОШ.

Література

1. Role of lipid peroxidation and oxygen radicals in compound 48/80-induced gastric mucosal injury in rats / T.Takemura, T.Yoshikawa, N.Yoshida [et al.] // *Scand. J. Gastroenterol.* - 1989. - Vol.162. - P.51-54.
2. Gastric mucosal phosphatidylcholine hydroperoxide increases during cold water-immersion restraint stress in rats / W.M.Shian, I.Sasaki, Y.Kamiyama [et al.] // *Tohoku. J. Exp. Med.* - 1995. - Vol.176, № 2. - P.127-130.
3. Liu J. Immobilization stress-induced antioxidant defense changes in rat plasma: effect of treatment with reduced glutathione / J.Liu, X.Wang, A.Mori // *Int. J. Biochem.* - 1994. Vol.26, № 4. - P.511-517.
4. Adaptive HNE-Nrf2-HO-1 pathway against oxidative stress is associated with acute gastric mucosal lesions / K.Ueda, T.Ueyama, K.Yoshida [et al.] // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.* - 2008. - Vol.295, № 3. - P. 460-469.
5. Kwiecien S. Effects of reactive oxygen species action on gastric mucosa in various models of mucosal injury / S.Kwiecien, T.Brzozowski, S.J.Konturek // *J. Physiol. Pharmacol.* - 2002. - Vol.53, № 1. - P.39-50.
6. Limdi J.K. Do probiotics have a therapeutic role in gastroenterology? / J.K.Limdi, C.O'Neill, J. McLaughlin // *World J Gastroenterol.* - 2006. - Vol.12, № 34. - P.5447-5457.
7. Bifidobacterium infantis strains with and without a combination of oligofructose and inulin (OFI) attenuate inflammation in DSS-induced colitis in rats / N.Osman, D.Adawi, G.Molin [et al.] // *BMC Gastroenterol.* - 2006. - Vol.6. - P.31.
8. A probiotic strain of *Bacillus polyfermenticus* reduces DMH induced precancerous lesions in F344 male rat / E.Park,

G.I.Jeon, J.S.Park [et al.] // *Biol. Pharm. Bull.* - 2007. - Vol.30, № 3. - P.569-574.

9. Probiotics enhance pancreatic glutathione biosynthesis and reduce oxidative stress in experimental acute pancreatitis / F.Lutgendorff, L.M Trulsson., L.P.van Minnen [et al.] // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.* - 2008. - Vol.295, № 5. - P.G1111-1121.

10. Вірченко О.В. Дослідження лікувально-профілактичного впливу мультипробиотика "Симбітер" при розвитку гострих уражень в слизовій оболонці шлунка щурів / О.В.Вірченко, О.І.Цирюк // *Вісник проблем біології і медицини.* - 2010. - № 1. - С.41-46.

11. Rozemond H. Laboratory animal protection: the European Convention and the Dutch Act / H.Rozemond // *Vet Q.* - 1986. - Vol.8, № 4. - P.346-349.

12. Takagi K. Studies on the Drugs for Peptic Ulcer. A Reliable Method for Producing Stress Ulcer in Rats / K.Takagi, Y.Kasuya, K.Watanabe // *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo).* - 1964. - Vol.12. - P.465-472.

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

14. Тимирбулатов Р.А. Метод повышения интенсивности СРО липидосодержащих компонентов крови и его диагностическое значение / Р.А.Тимирбулатов, Е.М.Селезнев // *Лабораторное дело.* - 1981. - № 4. - С.209-211.

15. Колесова О.Е. Перекисное окисление липидов и методы определения продуктов липопероксидации в биологических средах / О.Е.Колесова, А.А.Маркин, Т.Н.Федорова // *Лабораторное дело.* - 1984. - № 9. - С.540-546.

16. Чевари С. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологических материалах / С.Чевари, И.Чаба, Й.Секей // *Лабораторное дело.* - 1985. - № 11. - С.678-681.

17. Королюк М.А. Метод определения активности каталазы / М.А.Королюк, Л.И.Иванова, И.Г.Майорова // *Лабораторное дело.* - 1998. - № 1. - С.16-19.

Резюме

Вірченко О.В., Фалалеева Т.М., Берегова Т.В., Дворщенко К.О., Янковський Д.С. Вплив мультипробиотика "Симбітер ацидофільний концентрований" на стан перекисного окислення ліпідів в плазмі щурів за умов стрес-індукованого виразкоутворення.

Дослідження було проведене на білих беспородних щурах, підданих дії 3-годинного водно-імобілізаційного стресу. Встановлено, що мультипробиотик "Симбітер ацидофільний концентрований" зменшує вміст продуктів перекисного окислення ліпідів у плазмі крові, концентрація яких зростає в результаті дії стресу. Вплив на стан антиоксидантної системи за умов дії ВІС не виражений. Антиоксидантна дія Симбітеру корелює з його позитивним впливом на гоєння стрес-індукованих виразково-ерозійних уражень СОШ і є одним з механізмів його гастропротекторної дії.

Ключові слова: мультипробиотик, перекисне окислення ліпідів, антиоксидантна система, водно-імобілізаційний стрес, виразкоутворення.

Резюме

Вірченко А.В., Фалалеева Т.М., Береговая Т.В., Дворщенко К.А., Янковский Д.С. Влияние мультипробиотика "Симбитер ацидофильный концентрированный" на состояние перекисного окисления липидов в плазме крыс в условиях стресс-индуцированного язвообразования.

Исследование было проведено на белых беспородных крысах, подданных действию 3-х часового водно-иммобилизационного стресса. Установлено, что мультипробиотик "Симбитер ацидофильный концентрированный" уменьшает содержание продуктов перекисного окисления липидов в плазме крови, концентрация которых возрастает в результате действия стресса. Влияние на состояние антиоксидантной системы в условиях действия ВИС не выражено. Антиоксидантное действие Симбитера коррелирует с его ранее установленным позитивным влиянием на лечение стресс-индуцированных язвенно-эрозивных поражений СОЖ крыс и является одним из механизмов его гастропротекторного действия.

Ключевые слова: мультипробиотик, перекисное окисление липидов, антиоксидантная система, водно-иммобилизационный стресс, язвообразование.

Summary

Virchenko O.V., Falalyeyeva T.M., Beregova T.V., Dvorschenko K.O., Yankovsky D.S. Influence of multiprobiotic "Symbiter acidophilic concentrated" on the lipid peroxidation in the plasma of rats under stress-induced ulceration.

The study was carried out on white rats, subjected to 3-hour water immersion restraint stress (WIRS). It was established, that multiprobiotic "Symbiter acidophilic concentrated" reduces the content of products of lipid peroxidation in blood plasma, whose concentration increases as a result of stress. Its influence on the antioxidant system in terms of the WIRS is not significant. Antioxidant action of Symbiter correlates with its previously established positive influence on the treatment of stress-induced gastric mucosa lesions in rats and is one of the mechanisms of its gastroprotective action.

Key words: multiprobiotic, lipid peroxidation, antioxidant system, water immersion restraint stress, ulceration.

Рецензент: д.біол.н., проф. Б.П.Романюк