

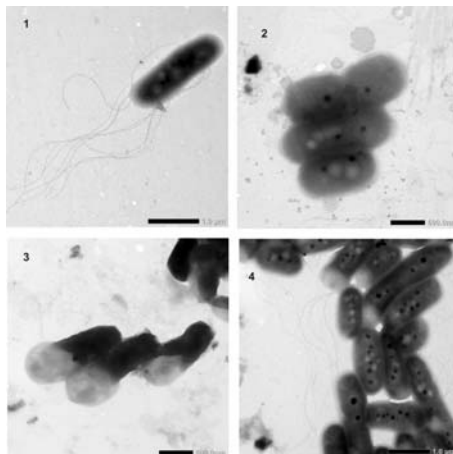


Рис. 2. Морфологія клітин *Stenotrophomonas maltophilia* в електронному мікроскопі:

1 – вихідний штам – клітини однорідні, циліндричної форми зі джгутиками; 2 – варіант, що культивувався 1 пасаж на МПА з ДСН (50 мг/л) – клітини вкорочені; 3 – варіант, що культивувався 4 пасажи на МПА з ДСН (50 мг/л) – клітини деформовані, вкорочені; 4 – варіант, що культивувався 10 пасажами на МПА з ДСН (50 мг/л) – клітини різної довжини, але їх морфологія відновлюється; чітко видно темні і прозорі включення

Після 4 пасажу клітини *S. maltophilia* виглядали деформованими, роздутими з одного кільця, що можливо пов'язано з ушкодженням клітинної стінки поверхнево-активною речовиною. Спостерігалася поява у цитоплазмі значних зон з різною оптичною щільністю. В клітинах *S. maltophilia* після 10 пересівів на МПА з ДСН було чітко видно збільшення кількості темних і прозорих округлих включень різного розміру, які розміщувалися вздовж клітин. Зміна морфології вказує на суттєвий негативний вплив ДСН на клітини *S. maltophilia* за культивування на середовищі з цим ксенобіотиком і на тенденцію до їх поступової адаптації.

Висновки. Таким чином, було показано, що культивування бактерій *Stenotrophomonas maltophilia* на МПА з незначним вмістом (50 мг/л) аніонної поверхнево-активної речовини додецилсульфатом натрію призводить до зміни морфології клітини, а саме: зменшення довжини, деформації, утворення ланцюжків і великої кількості включень з різною щільністю, погане поглинання барвника. Часткове відновлення морфології спостерігали після десятого пасажу, що може свідчити про поступову адаптацію культури до аніонної ПАР.

Список використаної літератури. 1. Михальський Л.О., Фуртат І. М., Радченко О.С., Степура Л.Г. Вплив синтетичних поверхнево-активних речовин на деякі біологічні властивості непатогенних видів роду *Corynebacterium* // Мікробіол. журн. – 2006. – Т.68, №3. – С.52-61. 2. Практикум із загальної мікробіології / Радченко О.С., Степура Л.Г., Домбровська І.В. та ін.; за ред. В.К.Позура. – К., 2011. 3. Протасова М.О., Собко В.М., Козлова І.П. Адгезія і колонізація поверхні скла *Thiobacillus thioararus* та *Stenotrophomonas maltophilia* та їх бінарною культурою // Мікробіол.журн. – 2005. – 67, №6. – С 57-63. 4. Радченко О.С., Степура Л.Г., Зелена П.П. Вплив додецилсульфату натрію на деякі біологічні властивості *Staphylococcus aureus* // ВІСНИК Київського національного університету імені Тараса Шевченка. – 2011. – БІОЛОГІЯ. 58. – С.37-39. 5. Ставская С. С., Удод В. М., Таранова Л. А., Кривец І. А. Микробиологическая очистка воды от поверхностно-активных веществ. – К., 1988. 6. Фуртат І.М., Ногіна Т.М., Михальський Л.О. та ін. Вплив поверхнево-активних речовин на деякі біологічні властивості *Corynebacterium glutamicum* // Національний університет "Києво-Могилянська Академія" Наукові записки. – 2002. – 20, 2. – С.435-438. 7. Mendelson N.H., Haag S.M., Cole R.M. Cellular organization of *Bacillus subtilis*: sodium dodecyl sulfate-induced cell partitioning into zebra structure // Journal of Bacteriology. – 1976. – V.126, N3. – P.1285-1296. 8. Solheim M., Aakra A., Vebo H., et al Transcriptional responses of *Enterococcus faecalis* V583 to bovine bile and sodium dodecyl sulfate // Appl.Environ.Microbiol. – 2007. – V.73, N18. – P.5767–5774. 9. Woldringh C.L., van Isteron W. Effect of treatment with sodium dodecyl sulfate on the ultrastructure of *Escherichia coli* // Journal of Bacteriology. – 1972. – V.111, N3. – P.801-813.

Надійшла до редколегії 05.11.12

УДК 577.352.38

К. Дворченко, канд. біол. наук, С. Вакал, асп.,
А. Драничина, канд. біол. наук, Л. Остапченко, проф.

ВІЛЬНОРАДИКАЛЬНІ ПРОЦЕСИ У ПІДШЛУНКОВІЙ ЗАЛОЗІ ЗА УМОВ ТРИВАЛОЇ ГІПОАЦИДНОСТІ ТА ПРИ ДІЇ МУЛЬТИПРОБІОТИКА СИМБІТЕР

Встановлено, що у підшлунковій залозі щурів при тривалій гіпоацидності активувались вільнорадикальні процеси: зростає вміст супероксидного аніон-радикалу і оксиду азоту та збільшувались ксантиноксидазна та загальна NO-синтазна активності. Мультипробіотик Симбітер суттєво знижував інтенсивність вільнорадикальних реакцій у підшлунковій залозі щурів за умов тривалої шлункової гіпохлоргідрії.

Ключові слова: вільнорадикальні процеси, гіпоацидність, Симбітер.

Установлено, что в поджелудочной железе крыс при длительной гипоацидности активировались свободнорадикальные процессы: возрастало содержание супероксидного анион-радикала и оксида азота и увеличивались ксантиноксидазная и общая NO-синтазная активность. Мультипробіотик Симбітер существенно снижал интенсивность свободнорадикальных реакций в поджелудочной железе крыс при длительной желудочной гипохлоргидрии.

Ключевые слова: свободнорадикальные процессы, гипоацидность, Симбітер.

The free radical processes were activated in rat pancreas upon long-term hypoacidic conditions. The contents of both superoxide anion-radical and nitric oxide were elevated and xanthine oxidase and NO-synthase activities were increased. The multiprobiotic Symbiter significantly decreased the intensity of free radical reactions in rat pancreas upon long-term gastric hypoacidity.

Keywords: free-radical processes, hypoacid, Symbiter.

Вступ. Однією з **універсальних** складових клітинних ушкоджень є інтенсифікація вільнорадикальних процесів,

яка може бути наслідком гіперпродукції вільних радикалів та нестачі системи антиоксидантного захисту. Ініціацію вільнорадикальних реакцій в клітині здійснюють ак-

© Дворченко К., Вакал С., Драничина А., Остапченко Л., 2013

тивні форми кисню та азоту. Активні форми кисню (АФК) та азоту (АФА) належать до молекул з чіткими хімічними та біологічними властивостями. До АФК відносяться всі окисні та збудливі стани молекули кисню, які виникають у фізіологічних умовах, включаючи супероксид, синглетний кисень, гідроксильний радикал, перекис водню, інші пероксиди та гіпогалогеніти. До АФА належать оксид азоту та його проміжні окисно-відновні продукти, які з'являються за фізіологічних умов, включаючи нітросил, закис азоту, нітрозоній, диоксид азоту і деякі нестійкі аддукти оксиду азоту з біомолекулами, такими як S-нітрозотіоли та дінітрозильні комплекси заліза. Активні форми кисню та азоту є невід'ємною частиною внутрішньоклітинної сигналізації, але при надмірному утворенні вони можуть викликати пошкодження.

В останні роки значно розширились уявлення про роль АФК та АФА у різних фізіологічних і патологічних процесах, в тому числі, у патогенезі захворювань шлунково-кишкового тракту (ШКТ) [5, 6]. Зокрема, окисний стрес є важливою патогенетичною ланкою у розвитку як гострого, так і хронічного панкреатиту [9, 11]. Існує ряд даних про взаємозв'язок виникнення гострих панкреатитів на фоні тривалого прийому препаратів, що блокують шлункову секрецію гідрохлоридної кислоти [14, 16]. Для корекції структурно-функціональних порушень у ШКТ, застосовують пробіотики, як засоби, що сприяють відновленню гомеостазу за рахунок нормалізації мікрофлори у організмі. Особливої уваги в цьому сенсі заслуговують мультипробіотики, яким притаманний широкий спектр біологічної активності. До таких препаратів належить мультипробіотик "Симбітер® ацидофільний" концентрований (Симбітер), який характеризується полікомпонентністю (18 штамів бактерій родів *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* і *Propionibacterium*), широким спектром біологічної активності та взаємовідносинами міжпопуляційними відносинами.

Тому метою нашої роботи було дослідити активність вільнорадикальних процесів у підшлунковій залозі щурів за умов тривалої гіпоацидності та при введенні мультипробіотика Симбітер.

Об'єкт та методи досліджень. Дослідження проводили на білих нелінійних статевозрілих щурах-самцях масою тіла 180-220г з дотриманням загальних етичних принципів експериментів на тваринах, ухвалених Першим національним конгресом України з біоетики (вересень 2001 року), інших міжнародних угод та національного законодавства у цій галузі. Всіх тварин, яких було використано в досліді, утримували в стандартних клітках. Воду та збалансований гранульований корм тварини отримували *ad libitum*. Усіх тварин розділяли на

три експериментальні групи. У першій групі (контроль) щурам протягом 28 діб вводили внутрішньочеревно 0,2 мл та перорально 0,5 мл води для ін'єкцій. У другій групі щурів моделювали гіпоацидний стан за допомогою внутрішньочеревного введення 14 мг/кг омепразолу (Sigma, USA), 1 раз на добу протягом 28 діб. Тваринам третьої групи протягом 28 діб одночасно вводили омепразол внутрішньочеревно в дозі 14 мг/кг та мультипробіотик Симбітер (виробництва ТОВ "О.Д. Пролісок") перорально в дозі 0,14 мл/кг, розчинений у 0,5 мл води для ін'єкцій.

Вміст супероксидного аніон-радикалу визначали спектрофотометрично з використанням в якості акцептора електронів ХТТ [15]. Активність ксантиноксидази визначали за утворенням сечової кислоти з ксантину [4]. Визначення загальної NO-синтазної активності проводили згідно з методом [13], який полягає у визначенні приросту продуктів аеробного окислення оксиду азоту. Вміст оксиду азоту визначали за допомогою діазореакції з реактивом Грісса та обраховували із суми вмісту нітритів та нітратів, відновлених до нітритів азоту металевим цинком [1]. Статистичний аналіз проводили з використанням *t*-критерію Стюдента; вірогідними вважали дані при $P < 0,05$.

Результати та їх обговорення. При тривалому пригніченні шлункової секреції гідрохлоридної кислоти омепразолом у підшлунковій залозі вміст супероксидного аніон-радикалу зростав в 1,5 рази відносно контролю. За умов введення мультипробіотика Симбітер щурам з гіпоацидним станом цей показник знижувався в 1,2 рази порівняно з групою тварин, яким вводили лише омепразол (табл. 1). Супероксидні аніони генеруються за умов одноелектронного відновлення молекул кисню у мітохондріальних та мікосомальних електронтранспортних ланцюгах клітин підшлункової залози. Крім того, додатковим джерелом супероксиду може бути активність ксантиноксидази.

В наших дослідженнях показано, що ксантиноксидазна активність у підшлунковій залозі при тривалій шлунковій гіпохлоргідрії зростала в 1,3 рази відносно контролю (табл. 1). Зростання активності досліджуваного ензиму у підшлунковій залозі пов'язано з окисленням дисульфідних зв'язків ксантиндегідрогенази та перетворенням її на ксантиноксидазу, що може відбуватися за рахунок збільшення вмісту оксиду азоту [12]. При введенні мультипробіотика Симбітер щурам з гіпоацидним станом ксантиноксидазна активність знижувалась в 1,4 рази порівняно з тваринами, що отримували омепразол (табл. 1).

Таблиця 1. Вміст супероксидного аніон-радикалу та ксантиноксидазна активність у підшлунковій залозі щурів за умов тривалої гіпоацидності ($M \pm m$, $n=10$)

Група тварин	Параметр	Вміст супероксидного аніон-радикалу, $\mu\text{моль ХТТ-формази на } \mu\text{г протеїну}^{-1}$	Ксантиноксидазна активність, $\text{нмоль х хв}^{-1} \times \text{мг протеїну}^{-1}$
Контроль		$20,37 \pm 1,85$	$7,48 \pm 0,69$
Омепразол		$31,24 \pm 2,92^*$	$9,34 \pm 0,85^*$
Омепразол + Симбітер		$25,93 \pm 2,47^{**}$	$6,71 \pm 0,63^{**}$

Примітки: * – $p < 0,05$ порівняно з контролем; ** – $p < 0,05$ порівняно з групою тварин, яким вводили омепразол

Утворений супероксидний аніон-радикал у підшлунковій залозі за умов тривалої гіпоацидності в подальшому може приймати участь в реакціях, які спричинюють ураження панкреоцитів: перекисне окиснення ненасичених жирних кислот, окиснення SH-груп білків, пошкодження ДНК та ін. Токсичність супероксидних аніонів може зростати за рахунок вторинних реакцій, які призводять до утворення гідроксильних радикалів та синглетного кисню. Також, супероксидний аніон-

радикал здатний активувати синтазу оксиду азоту, яка утворює NO-радикал.

Встановлено, що при тривалій шлунковій гіпохлоргідрії у підшлунковій залозі загальна NO-синтазна активність зростала в 4 рази відносно контролю. За цих же умов експерименту у тканині підшлункової залози вміст оксиду азоту збільшувався в 2,3 рази порівняно з контрольною групою (табл. 2).

Таблиця 2. Загальна NO-синтазна активність та вміст NO₂⁻ у підшлунковій залозі щурів за умов тривалої гіпоацидності, (M ± m, n=10)

Група тварин	Параметр	Загальна NO-синтазна активність, нМоль х хв ⁻¹ х мг протеїну ⁻¹	Оксид азоту, нМоль х мг протеїну ⁻¹
Контроль		2,41 ± 0,23	1,31 ± 0,11
Омепразол		9,73 ± 0,95*	2,99 ± 0,27*
Омепразол + Симбітер		4,31 ± 0,42#	1,97 ± 0,18 [#]

Примітки: * – $p < 0,05$ порівняно з контролем; # – $p < 0,05$ порівняно з групою тварин, яким вводили омепразол

Збільшення вмісту оксиду азоту в клітині може викликати пошкодження білків та ДНК, що може призвести до структурного та функціонального пошкодження органу. У підшлунковій залозі деструктивній дії оксиду азоту найбільш піддаються бета-клітини острівців Лангенгарсу, дисфункція та деструкція яких вільними радикалами, і головним чином – оксидом азоту, є ключовою ланкою розвитку інсулінозалежного діабету [8].

При сумісному введенні омепразолу та мультипробіотика Симбітер у підшлунковій залозі знижувались NO-синтазна активність – в 2,3 рази, вміст оксиду азоту – в 1,5 рази по відношенню до групи щурів з гіпоацидним станом (табл. 2). Встановлене накопичення вільних радикалів у клітинах підшлункової залози за умов тривалої шлункової гіпохлоридії може бути пов'язане з розвитком гіпоксії. Потужним джерелом супероксидного аніон-радикалу є ланцюги переносу електронів – мітохондріальний та мікосомальний, де він утворюється за умов витоку електронів з відновлених елементів ланцюга на молекулярний кисень. Також в умовах гіпоксії посилюється трансформація ксантиндегідрогенази у ксантиноксидазу [10], яка ініціює утворення супероксидного аніон-радикалу, що спостерігається в тканині підшлункової залози за умов гіпоацидного стану. Супероксидний аніон-радикал відіграє вагомий роль у розвитку окисного стресу, оскільки він може перетворюватись в більш агресивні радикали, такі як гідроксильний та інші, що може спричинити пошкодження багатьох клітинних компонентів. Продуктом реакції супероксидного аніон-радикалу та оксиду азоту може бути утворення пероксинітриду (ONOOH), який є потужним окислювачем. Завдяки своїм властивостям пероксинітрид здатний викликати пошкодження широкого спектру молекул: окислювати NH- і SH-групи протеїнів, індукувати процеси перекисного окиснення ліпідів в мембранах та викликати одноланцюгові розриви ДНК. Таким чином, підвищення інтенсивності радикальних реакцій за умов тривалої гіпоацидності є первинним процесом, який постачає активні продукти, що здатні викликати пошкодження клітинних структур та дезорганізацію метаболізму у підшлунковій залозі. Зниження мультипробіотиком Симбітер інтенсивності вільнорадикальних реакцій у підшлунковій залозі обумовлені властивостями мікроорганізмів, що входять до його складу. Так, бактерії роду *Lactobacillus*, *Lactococcus* та *Bifidobacterium* синтезують супероксиддисмутазу, каталазу, відновлений глутатіон, які здатні знешкоджувати вільні радикали [2, 3, 7].

Висновки. Проведені дослідження свідчать про інтенсифікацію вільнорадикальних процесів у тканині підшлункової залози за умов тривалої гіпоацидного

стану, про що вказує збільшення вмісту супероксидного аніон-радикалу, оксиду азоту, ксантиноксидазної та загальної NO-синтазної активності. Мультипробіотик Симбітер суттєво знижує інтенсивність вільнорадикальних реакцій у панкреоцитах щурів при тривалій шлунковій гіпохлоридії, що дає підстави розглядати цей препарат як ефективний засіб корекції окисних пошкоджень тканини підшлункової залози при тривалих гіпоацидних станах.

Список використаної літератури. 1. Кіселик І.О., Луцик М.Д., Шевченко Л.Ю. Особливості визначення нітратів та нітритів в периферичній крові у хворих на вірусні гепатити та при синдромі жовтяниці іншої етіології // Лабор. діагностика – 2001. – №3. – С. 43-45. 2. Bruno-Bárcena J.M., Andrus J.M., Libby S.L., Klaenhammer T.R., Hassan H.M. Expression of a heterologous manganese superoxide dismutase gene in intestinal lactobacilli provides protection against hydrogen peroxide toxicity // Appl. Environ. Microbiol. – 2004. – Vol. 70(8). – P. 4702-4710. 3. de Moreno de LeBlanc A., LeBlanc J.G., Perdigón G., et al. Oral administration of a catalase-producing *Lactococcus lactis* can prevent a chemically induced colon cancer in mice // J. Med. Microbiol. – 2008. – Vol. 57(Pt 1). – P. 100-105. 4. Hashimoto S. A new spectrophotometric assay method of xanthine oxidase in crude tissue homogenate // Anal Biochem. – 1974. – Vol. 62(2). – P. 426-435. 5. Kim Y.J., Kim E.H. and Hahn K.B. Oxidative stress in inflammation-based gastrointestinal tract diseases: challenges and opportunities // J. Gastroenterol. Hepatol. – 2012. – Vol. 27(6). – P. 1004-1010. 6. Lundberg J.O. and Weitzberg E. Biology of nitrogen oxides in the gastrointestinal tract // Gut. – 2012. – Vol. 10. – P. 1-14. 7. Lutgendorff F., Trulsson L.M., Minnen L.P. Probiotics enhance pancreatic glutathione biosynthesis and reduce oxidative stress in experimental acute pancreatitis // Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. – 2008. – Vol. 295. – P. G1111-G1121. 8. Mandrup-Poulsen T., Corbett J.A., McDaniel M.L., Nerup J. What are the types and cellular sources of free radicals in the pathogenesis of type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus? // Diabetologia. – 1993. – Vol. 36(5). – P. 470-471. 9. Park B.K., Chung J.B., Lee J.H., et al. Role of oxygen free radicals in patients with acute pancreatitis // World J. Gastroenterol. – 2003. – Vol. 9(10). – P. 2266-2269. 10. Poss W.B., Huecksteadt T.P., Panus P.C., Freeman B.A., and Hoidal J.R. Regulation of xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase activity by hypoxia // Am. J. Physiol. Lung. Cell Mol Physiol. – 1996. – Vol. 270. – P. L941 – L946. 11. Que R.S., Cao L.P., Ding G.P., et al. Correlation of nitric oxide and other free radicals with the severity of acute pancreatitis and complicated systemic inflammatory response syndrome // Pancreas. – 2010. – Vol. 39(4). – P. 536-540. 12. Sakuma S., Fujimoto Y., Sakamoto Y., Uchiyama T., Yoshioka K., Nishida H., Fujita T. Peroxynitrite induces the conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in rabbit liver // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1997. – Vol. 230(2). – P. 476-479. 13. Salter M. Widespread tissue distribution, species and changes in activity of Ca²⁺-depend and Ca²⁺-independent nitric oxide synthases/ M. Salter, R.G. Knowles, S. Moncada // FEBS Lett. – 1991. – Vol. 291, №1. – P. 145-149. 14. Sundstrom A., Blomgren K., Alfredsson L., and Wiholm B.E. Acid-suppressing drugs and gastroesophageal reflux disease as risk factors for acute pancreatitis-results from a Swedish Case-Control Study // Pharmacoevidemol. Drug Saf. – 2006. – Vol. 15(3). – P. 141-149. 15. Sutherland M.W., Learmonth B.A. The tetrazolium dyes MTS and XTT provide new quantitative assays for superoxide and superoxide dismutase // Free Radic. Res. – 1997. – Vol. 27(3). – P. 283-289. 16. Youssef S.S., Iskandar S.B., Scruggs J., Roy T.M. Acute pancreatitis associated with omeprazole // Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. – 2005. – Vol. 43(12). – P. 558-561.

Надійшла до редколегії 05.10.12