

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

На правах рукопису

КОРОТКИЙ ОЛЕКСАНДР ГРИГОРОВИЧ

УДК 616-002.2:571.27:577.151.042:616.33-008.821.14

**БІОХІМІЧНІ МЕХАНІЗМИ РОЗВИТКУ ЗАПАЛЕННЯ
В ЩУРІВ З ТРИВАЛОЮ ШЛУНКОВОЮ ГІПОАЦИДНІСТЮ
ТА ЗА УМОВ ВВЕДЕННЯ МУЛЬТИПРОБІОТИКА «СИМБІТЕР®»**

03.00.04 – біохімія

Дисертація
на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Науковий керівник:
доктор біологічних наук, професор
Остапченко Людмила Іванівна

Київ – 2010

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	6
ВСТУП.....	8
ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	
РОЗДІЛ 1. БІОХІМІЧНІ АСПЕКТИ РОЗВИТКУ ЗАПАЛЕННЯ.....	14
1.1. Механізми розвитку запалення та оксидативного стресу.....	14
1.2. Біохімічні основи канцерогенезу, індукованого запаленням.....	19
1.3. Причини, механізми та наслідки розвитку запалення при тривалій шлунковій гіпоацидності.....	22
РОЗДІЛ 2. МЕХАНІЗМИ ДІЇ ТА ОСОБЛИВОСТІ ЗАСТОСУВАННЯ ПРОБІОТИКІВ.....	24
2.1. Молекулярно-біохімічні механізми дії пробіотиків.....	24
2.2. Перспективи застосування пробіотиків.....	28
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА	
РОЗДІЛ 3. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	33
3.1. Реактиви.....	33
3.2. Умови проведення експерименту.....	33
3.3. Отримання сироватки крові, лімфоїдних клітин тимуса та селезінки, зразків слизових оболонок шлунка та товстого кишечника.....	34
3.4. Аналіз видового і кількісного складу мікрофлори слизової оболонки шлунка та товстого кишечника.....	35
3.5. Визначення концентрації гастрину в сироватці крові.....	36
3.6. Визначення концентрації прозапальних цитокінів в сироватці крові.....	37
3.7. Визначення вмісту нітрит-іонів в сироватці крові.....	37
3.8. Визначення активності синтази оксиду азоту та вмісту нітрит-іонів у тимоцитах, спленоцитах, слизових оболонках шлунка та товстого кишечника.....	38
3.9. Визначення вмісту ТБК-активних продуктів.....	39

3.10. Визначення активності супероксиддисмутази.....	40
3.11. Визначення активності каталази.....	41
3.12. Флуорометричний метод визначення вмісту відновленого глутатіону.....	42
3.13. Визначення глутатіонпероксидазної активності.....	43
3.14. Визначення глутатіонтрансферазної активності.....	43
3.15. Визначення глутатіонредуктазної активності.....	44
3.16. Цитоморфологічна оцінка реакції лімфоїдних органів.....	45
3.17. Визначення титру інтерферону в супернатантах клітинних культур тимоцитів і спленоцитів.....	45
3.18. Визначення активності 2',5'-олігоаденілат-синтетази в тимоцитах і спленоцитах.....	46
3.19. Кількісне визначення білку.....	47
3.20. Статистична обробка результатів.....	47
РОЗДІЛ 4. ПОКАЗНИКИ МІКРОФЛОРИ ШЛУНКА І ТОВСТОГО КИШЕЧНИКА, КОНЦЕНТРАЦІЯ ГАСТРИНУ В СИРОВАТЦІ КРОВІ ЩУРІВ З ТРИВАЛОЮ ШЛУНКОВОЮ ГІПОАЦИДНІСТЮ ТА ЗА УМОВ ВВЕДЕННЯ МУЛЬТИПРОБІОТИКА «СИМБІТЕР®».....	
4.1. Видовий та кількісний склад мікрофлори слизових оболонок шлунка та товстого кишечника щурів за умов тривалого гіпоацидного стану в шлунку та введення мультипробіотика «Симбітер®».....	48
4.2. Концентрація гастрину в сироватці крові щурів з тривалою шлунковою гіпоацидністю та при дії мультипробіотика «Симбітер®».....	53
РОЗДІЛ 5. КОНЦЕНТРАЦІЯ ПРОЗАПАЛЬНИХ ЦИТОКІНІВ, ВМІСТ НІТРИТ-ІОНІВ І ТБК-АКТИВНИХ ПРОДУКТІВ, СТАН АНТИОКСИДАНТНОГО ЗАХИСТУ В СИРОВАТЦІ КРОВІ ЩУРІВ З ТРИВАЛОЮ ШЛУНКОВОЮ ГІПОАЦИДНІСТЮ ТА ЗА УМОВ ВВЕДЕННЯ МУЛЬТИПРОБІОТИКА «СИМБІТЕР®».....	
	56

5.1. Концентрація прозапальних цитокінів у сироватці крові щурів з тривалою шлунковою гіпоацидністю та за умов введення мультипробіотика «Симбітер®»..... 56

5.2. Вміст нітрит-іонів у сироватці крові щурів з тривалим пригніченням шлункової секреції соляної кислоти та за умов введення мультипробіотика «Симбітер®»..... 60

5.3. Вміст ТБК-активних продуктів в сироватці крові щурів з тривалою шлунковою гіпоацидністю та за умов введення мультипробіотика «Симбітер®»..... 63

5.4. Вміст відновленого глутатіону й активність антиоксидантних ферментів у сироватці крові щурів з тривалою гіпоацидністю шлункового соку та за умов введення мультипробіотика «Симбітер®»..... 67

РОЗДІЛ 6. ВМІСТ НІТРИТ-ІОНІВ, ТБК-АКТИВНИХ ПРОДУКТІВ, ВІДНОВЛЕНОГО ГЛУТАТІОНУ, АКТИВНІСТЬ СИНТАЗИ ОКСИДУ АЗОТУ Й АНТИОКСИДАНТНИХ ФЕРМЕНТІВ У СЛИЗОВИХ ОБОЛОНКАХ ШЛУНКУ ТА ТОВСТОГО КИШЕЧНИКА ЩУРІВ З ТРИВАЛОЮ ШЛУНКОВОЮ ГІПОАЦИДНІСТЮ ЗА УМОВ ВВЕДЕННЯ МУЛЬТИПРОБІОТИКА «СИМБІТЕР®»..... 76

6.1. Активність синтази оксиду азоту та вміст нітрит-іонів у слизових оболонках шлунка та товстого кишечника щурів з тривалою шлунковою гіпоацидністю та за умов введення мультипробіотика «Симбітер®»..... 76

6.2. Вміст ТБК-активних продуктів у слизових оболонках шлунка і товстого кишечника щурів з тривалою шлунковою гіпоацидністю та за умов введення мультипробіотика «Симбітер®»..... 80

6.3. Вміст відновленого глутатіону й активність антиоксидантних ферментів у слизових оболонках шлунка та товстого кишечника щурів з тривалою шлунковою гіпоацидністю за умов введення мультипробіотика «Симбітер®»..... 84

РОЗДІЛ 7. ЦИТОМОРФОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ТИМУСА ТА СЕЛЕЗІНКИ ЩУРІВ І ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН ЇХ ЛІМФОЇДНИХ КЛІТИН ЗА УМОВ ТРИВАЛОЇ ШЛУНКОВОЇ ГІПОАЦИДНОСТІ ТА ВВЕДЕННЯ МУЛЬТИПРОБІОТИКА «СИМБІТЕР®».....	91
7.1. Цитоморфологічний стан тимуса та селезінки щурів з тривалою шлунковою гіпоацидністю за умов введення мультипробіотика «Симбітер®».....	91
7.2. Титр інтерферону в супернатантах клітинних культур тимоцитів і спленоцитів щурів з тривалим гіпоацидним станом та за умов введення мультипробіотика «Симбітер®».....	96
7.3. Активність 2',5'-олігоаденілатсинтетази в тимоцитах і спленоцитах щурів з тривалою гіпоацидністю шлункового соку та за умов введення мультипробіотика «Симбітер®».....	100
7.4. Активність синтази оксиду азоту та вміст нітрит-іонів у тимоцитах і спленоцитах щурів з тривалою шлунковою гіпоацидністю за умов введення мультипробіотика «Симбітер®».....	105
7.5. Вміст ТБК-активних продуктів у тимоцитах і спленоцитах щурів з тривалою шлунковою гіпоацидністю та за умов введення мультипробіотика «Симбітер®».....	110
7.6. Вміст відновленого глутатіону й активність антиоксидантних ферментів у тимоцитах і спленоцитах щурів з тривалою шлунковою гіпоацидністю та за умов введення мультипробіотика «Симбітер®».....	114
ЗАКЛЮЧЕННЯ.....	121
ВИСНОВКИ.....	130
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	132

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

- АОЗ – антиоксидантний захист
АФК – активні форми кисню
ГП – глутатіонпероксидаза
ГР – глутатіонредуктаза
ГТ – глутатіонтрансфераза
ЕДТА – етилендіамінтетраоцтова кислота
ІФН – інтерферон
КАТ – каталаза
НСТ – нітросиній тетразолій
2',5'-ОАС – 2',5'-олігоаденілатцитеттаза
ОМ – смепазол
ОРТ – ортофталевий альдегід
ПОЛ – перекисне окислення ліпідів
СИМ – симбітер
СОД – супероксиддисмутаза
ТБК – тіобарбітурова кислота
ТМ – триетаноламінова суміш
ТХО – трихлороцтова кислота
ФГА – фітогемаглютинін
ФМС – феназинметасульфат
ФНП- α – фактор некрозу пухлин альфа
ХДНБ – 1-хлор-2,4-динітробензол
ЦФН – циклоферон
ШКТ – шлунково-кишковий тракт
GSH – відновлена форма глутатіону
GSSG – окислена форма глутатіону
IL-1 β – інтерлейкін-1 β
IL-6 – інтерлейкін-6

eNOS – ендотеліальна нітрооксидсинтаза

iNOS – індуцибельна нітрооксидсинтаза

nNOS – нейрональна нітрооксидсинтаза

NO – оксид азоту

NO_2^- – нітрит-іон

NOS, NO-синтаза – нітрооксидсинтаза

ВСТУП

Актуальність теми. Тривале пригнічення шлункової секреції соляної кислоти здатне призводити до ряду негативних наслідків, зокрема до розвитку гіпергастринемії, анемії, дефіциту вітаміну В12, заліза, кальцію та порушення мікробіоценозу в травному тракті [1]. У свою чергу ці наслідки можуть викликати розвиток запалення, яке спричиняє пошкодження слизових оболонок в травному тракті.

Запалення є одним з найбільш важливих біологічних процесів і, ймовірно, найчастішою причиною захворювань. Запальні процеси супроводжують більшість патологічних станів людини, тому з'ясування механізмів їх розвитку є фундаментальною загальнобіологічною проблемою, що має велике прикладне значення [2]. Останнім часом запальний процес розглядається як один з головних чинників розвитку пухлин [3], в тому числі в травному тракті [4, 5, 6]. Запалення відіграє визначальну роль на різних етапах розвитку пухлин за рахунок посилення продукції прозапальних цитокінів і вільних радикалів, що пошкоджують клітини та володіють мутагенними властивостями. З іншого боку пухлинний процес може сприяти продукції медіаторів запалення та накопиченню активних форм кисню та азоту [6, 7, 8]. На сьогодні причинно-наслідковий зв'язок між запаленням, імунітетом і раком набув широкого визнання, проте багато з молекулярних, біохімічних і клітинних механізмів цього зв'язку залишаються нез'ясованими [7].

Крім запалення основними факторами ризику розвитку раку в шлунково-кишковому тракті є також гіпергастринемія [9] та дисбактеріоз [10], які виникають за умов тривалої шлункової гіпоацидності. До 20 % пухлин пов'язані з хронічними інфекціями [11]. Існує багато доказів того, що розвиток деяких пухлин ініціюється інфекціями [12] із залученням вищезгаданих механізмів розвитку запалення [7, 13].

Для корекції та лікування хронічних запальних та інфекційних захворювань шлунково-кишкового тракту зазвичай використовують пробіотики [14, 15]. В той же час накопичуються докази їх значно ширшої функціональної

активності. Пробиотичні мікроорганізми не лише нормалізують мікрофлору травного тракту, але й здатні впливати на імунні реакції, продукувати вітаміни, гормони, антимікробні субстанції та коротколанцюгові жирні кислоти, виявляють антиканцерогенні й антимуутагенні властивості, тощо [16, 17]. Останнім часом почали з'являтися роботи, які підтверджують ефективність застосування пробіотиків у лікуванні раку товстого кишечника [18, 19]. Проте, не зважаючи на активне дослідження впливу пробіотиків на різні патологічні процеси, механізми їх дії залишаються недостатньо вивченими.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Роботу виконано в науково-дослідній лабораторії «Фізико-хімічної біології» Навчально-наукового центру «Інститут біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка у рамках науково-дослідної теми «Визначення біохімічних, генетичних, імунологічних та цитологічних маркерів розвитку патологічних станів організму з метою розробки засобів направленої корекції і профілактики» (№ д/р 0106U005750).

Мета та завдання дослідження. Метою роботи було з'ясувати біохімічні механізми розвитку запалення в щурів з тривалою шлунковою гіпоацидністю та за умов введення мультипробиотика «Симбітер®».

Для досягнення мети досліджень було поставлено такі завдання:

1. Дослідити кількісний та якісний склад мікрофлори шлунка і товстого кишечника на фоні тривалого шлункового пригнічення секреції соляної кислоти та за умов введення мультипробиотика «Симбітер®».
2. Визначити концентрацію гастрину в сироватці крові щурів з тривалою шлунковою гіпоацидністю та за умов введення мультипробиотика «Симбітер®».
3. Визначити концентрацію інтерферону- γ , фактору некрозу пухлин- α , інтерлейкіну- 1β та інтерлейкіну-6 в сироватці крові щурів за умов тривалої шлункової гіпоацидності та при введенні мультипробиотика «Симбітер®».
4. Визначити активність синтази оксиду азоту та вміст нітрит-іонів у сироватці крові, тимоцитах, спленоцитах, слизових оболонках шлунка і

товстого кишечника щурів з тривалим гіпоацидним станом та за умов введення мультипробіотика «Симбітер®».

5. Дослідити процеси перекисного окислення ліпідів і стан системи антиоксидантного захисту в сироватці крові, тимоцитах, спленоцитах, слизових оболонках шлунка та товстого кишечника щурів з тривалою шлунковою гіпоацидністю а також за умов введення мультипробіотика «Симбітер®».

6. Оцінити цитоморфологічну реакцію тимуса та селезінки щурів на введення мультипробіотика «Симбітер®» за умов тривалого пригнічення шлункової секреції соляної кислоти.

7. Дослідити продукцію інтерферону й активність 2',5'-олігоаденілатсинтетази в тимоцитах і спленоцитах щурів з тривалою шлунковою гіпоацидністю та за умов введення мультипробіотика «Симбітер®».

Об'єкт дослідження: біохімічні механізми розвитку запалення.

Предмет дослідження: вплив мультипробіотика «Симбітер®» на розвиток запальних процесів за умов дисбактеріозу та гіпергастринемії на фоні тривалої шлункової гіпоацидності.

Методи дослідження: цитологічні, мікробіологічні (дослідження мікрофлори шлунка та товстого кишечника), вірусологічні (визначення титру інтерферону в супернатантах тимоцитів і спленоцитів), центрифугування (виділення клітин), спектрофотометричні (визначення активностей синтази оксиду азоту, 2'5'-олігоаденілатсинтетази, антиоксидантних ферментів та вмісту ТБК-активних продуктів, тощо), спектрофлюорометричні (визначення вмісту відновленого глутатіону), радіоімунні (визначення концентрації гастрину), імуноферментні (визначення концентрації цитокінів) та методи математичної статистики.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше проведено комплексне дослідження біохімічних механізмів розвитку запальних процесів у щурів за умов тривалого пригнічення шлункової секреції соляної кислоти та при введенні мультипробіотика «Симбітер®». Продемонстровано, що тривала

шлункова гіпоацидність, викликана 28-добовим введенням омепразолу, одночасно призводить до порушень мікробіоценозу в шлунку і товстому кишечнику та гіпергастринемії, які є причинами розвитку запалення. Вперше показано залучення за умов тривалого гіпоацидного стану до розвитку запального процесу інтерферону- γ , фактору некрозу пухлин- α , інтерлейкіну- 1β , оксиду азоту, порушення процесів перекисного окислення ліпідів і функціонування антиоксидантного захисту в сироватці крові, слизових оболонках шлунку та товстого кишечника, лімфоїдних клітинах тимуса та селезінки щурів. Встановлено, що тривале пригнічення кислотоутворення в шлунку призводить до гомеостатичних перебудов у тимусі та селезінці щурів, посилення спонтанної та стимульованої фітогемаглютиніном і циклофероном продукції інтерферону тимоцитами та спленоцитами, а також до зниження активності 2',5'-олігоаденілатсинтетази в досліджуваних лімфоїдних клітинах.

Вперше показано, що мультипробіотик «Симбітер®» володіє протизапальними, імуномодулюючими властивостями та здатністю впливати на процеси перекисного окислення ліпідів і функціонування антиоксидантної системи. Виявлено, що введення мультипробіотика «Симбітер®» спричинює посилення проліферативних процесів у тимусі та селезінці, продукції інтерферону в тимоцитах і спленоцитах, що свідчить про інтерфероногенні властивості цього препарату, але не впливає на активність 2',5'-олігоаденілатсинтетази в досліджуваних імунних клітинах щурів.

Практичне значення одержаних результатів. Отримані результати поглиблюють існуючі уявлення про біохімічні механізми розвитку запалення за умов тривалої шлункової гіпоацидності.

Встановлено, що мультипробіотик «Симбітер®» здатен частково усувати та зменшувати негативні наслідки тривалого пригнічення шлункової секреції соляної кислоти, в тому числі запальний процес. З'ясування механізмів модулюючої дії мультипробіотика «Симбітер®» сприятиме його подальшому впровадженню в клінічну практику лікування кислотоасоційованих

захворювань з метою подолання та профілактики негативних наслідків тривалої шлункової гіпоацидності.

Одержані дані можуть бути також використані в навчальному процесі з біологічних і медичних спеціальностей.

Особистий внесок здобувача. Автором особисто виконано пошук та аналіз наукових літературних джерел за темою дисертації, проведено експериментальні дослідження, статистичну обробку та теоретичне обґрунтування одержаних результатів. Планування напрямків досліджень, розробка методичних підходів, обговорення та аналіз одержаних результатів проведено за участі наукового керівника д.б.н., проф. Остапченко Л.І.

Робота з піддослідними тваринами, радіоімунні, мікробіологічні та морфологічні дослідження проводились у співпраці з к.б.н., н.сп. Цирюк О.І. з відділу фармако-фізіології та асп. Радчук О.М. з НДС «Цитофізіології» НДІ фізіології імені академіка Петра Богача Київського національного університету імені Тараса Шевченка під керівництвом д.б.н., проф. Берегової Т.В. Визначення титру інтерферону в супернатантах клітинних культур тимоцитів і спленоцитів виконано спільно з к.б.н., пров.н.сп. лабораторії імунології відділу клітинних і тканинних технологій Інституту генетичної та регенеративної медицини НАМН України Нікольською В.В.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертації доповідались та обговорювались на 5 International Symposium On Cell/Tissue Injury and Cytoprotection/Organoprotection (Yalta, Ukraine, 2008); III Міжнародній конференції молодих науковців «Біологія: від молекули до біосфери» (Харків, Україна, 2008); Науково-практичній конференції «Біологічно активні речовини: фундаментальні та прикладні питання отримання та застосування» (Новий Світ, Україна, 2009); 11 Міжнародному Слов'яно-Балтійському науковому форумі "Санкт-Петербург – Гастро-2009" (Санкт-Петербург, Росія, 2009); Міжнародній науковій конференції «Системна організація психофізіологічних та вегетативних функцій» (Луцьк, Україна, 2009); VII Parnas Conference on biochemistry and molecular biology (Yalta,

Ukraine, 2009); IX Всеукраїнській науковій конференції студентів та молодих науковців «Біологічні дослідження молодих учених в Україні» (Київ, Україна, 2009); XVII International Conference «GASTRO-2009 UEGW/WCOG» (London, United Kingdom, 2009); IV Міжнародній конференції молодих науковців «Біологія: від молекули до біосфери» (Харків, Україна, 2009); 44 Annual Scientific Meeting of the European Society for Clinical Investigation (Bari, Italy, 2010); 12 Міжнародному Слов'яно-Балтійському науковому форумі "Санкт-Петербург – Гастро-2010" (Санкт-Петербург, Росія, 2010); 35 FEBS Congress «Molecules of life» (Gothenburg, Sweden, 2010); VI Міжнародній конференції «Біоресурси та віруси» (Київ, Україна, 2010); X Українському Біохімічному З'їзді (Одеса, Україна, 2010); Науково-практичній конференції з міжнародною участю «Генетична і регенеративна медицина: проблеми та перспективи» (Київ, Україна, 2010).

Публікації. За результатами досліджень опубліковано 20 наукових праць, з яких 5 статей у фахових наукових виданнях, затверджених переліком ВАК України, та 15 тез доповідей у матеріалах вітчизняних та міжнародних наукових конференцій та з'їздів.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається зі вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів досліджень, 3 розділів результатів власних досліджень з їх обговоренням, заключення, висновків, списку використаних літературних джерел (345 посилань). Дисертація викладена на 131 сторінці і проілюстрована 18 рисунками та 7 таблицями.

Висновки біоетичної експертизи. Роботу виконано на білих нелінійних щурах, які утримувались в умовах стандартного раціону віварію. Впродовж усього експерименту тварини не зазнавали жорстокого поводження і негуманного умиртвлення. Дослідження відповідають основним вимогам щодо утримання та роботи з лабораторними тваринами згідно правил Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, які використовуються в експериментальних дослідженнях та інших наукових цілях, та згідно етичних норм у відповідності до українського законодавства.

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

РОЗДІЛ 1

БІОХІМІЧНІ АСПЕКТИ РОЗВИТКУ ЗАПАЛЕННЯ

1.1. Механізми розвитку запалення та оксидативного стресу

Запалення – захисна реакція організму, спрямована на елімінацію ендогенних та екзогенних антигенів, а також у відповідь на фізичне пошкодження клітин [20]. Запалення часто викликається продуктами розпаду мікроорганізмів, грибів, вірусів, а при впливі агресивних факторів – і власних клітин. Продукти розпаду інвазивних агентів виявляються групою специфічних образрозпізнавальних рецепторів, які запускають систему протеїнкіназ. Вони фосфорилують і активують білкові фактори транскрипції (AP-1, STAT та ранній запальний ядерний фактор NF-κB), які передають генам сигнали для індукції синтезу РНК а потім і білків. Особливо важливу роль при запаленні відіграють регуляторні білки/пептиди та ферменти. Одними з основних ініціаторів запального процесу вважаються цитокіни, функції яких перекриваються: різні цитокіни можуть чинити однаковий чи протилежний ефект та є плейотропними [21]. Цитокіни є розчинними посередниками внутрішньоклітинних зв'язків та регулюють розвиток, відновлення тканин, кровотворення, запалення, а також специфічні та неспецифічні імунні реакції. Зв'язування цитокінів з їх рецепторами ініціює передачу позаклітинної інформації в цитоплазму та ядро [22]. Рецептори цитокінів, як правило, безпосередньо пов'язані з іонними каналами або G-білками. Інформація передається через різні сигнальні шляхи, зокрема: ядерний фактор транскрипції NF-κB і мітоген-активовані протеїн-кінази (МАРК) [23]. Цитокіни стимулюють та індують цілий ряд інших білків і пептидів [21]:

- хемокіни;
- молекули адгезії лейкоцитів та ендотелію (інтегрини, селектини, адресини);

- ферменти (фосфоліпазу A₂, циклооксигенази-1 і -2, 5-ліпооксигеназу, синтазу фактора активації тромбоцитів, індукцибельну синтазу оксиду азоту, матриксні металопротеїнази, НАДФН-оксидази фагоцитів та ендотелію, ксантиноксидазу, мієлопероксидазу, гідролазу, протеїнкінази, тирозинкінази та інші);
- систему комплементу, кініни, фактори згортання крові та фібринолізу;
- білки гострої фази: С-реактивний білок, сироватковий амілоїдний А-білок α_1 , α_1 -антипептидазу, α_2 -макроглобулін, фібриноген, гаптоглобін та інші.

Хемокіни – окрема група цитокінів, які діють через G-білок спряжені рецептори, активують та спричиняють хемотаксис компетентних клітин до осередку запалення.

Молекули клітинної адгезії через свої рецептори (селектини, інтегрини, адресини) на клітинах крові та ендотелію викликають спочатку прилипання клітин крові до останнього, а потім забезпечують проникнення через стінку судин та еміграцію до осередку запалення.

Ферменти синтезують гормони та інші регулятори запалення: ліпіди (ейкозаноїди, фактор активації тромбоцитів, глюкокортикоїди), аміни (гістамін, серотонін, катехоламіни), білки та пептиди (цитокіни, хемокіни, кініни, опіоїди, ангіотензин II, лептин), аденозин тощо. Фосфоліпаза A₂ відщеплює від фосфоліпідів поліненасичені жирні кислоти, які перетворюються до ейкозаноїдів: простаноїдів – циклооксигеназами, та лейкотрієнів – ліпооксигеназою. Простогландини викликають запалення, біль і гіпертермію, лейкотрієни – запалення та гіперчутливість. Ферменти виконують також інші важливі функції: альтерація реалізується активними формами як кисню (вільні радикали супероксид O₂[•], гідроксил HO[•] а також H₂O₂), так і азоту (NO[•] - синтазою макрофагів) [21].

Однак природна захисна реакція часто виявляється недостатньою. Тоді організм залучає другу лінію захисту – імунне запалення, що супроводжується активацією клітинної та гуморальної ланок імунної відповіді, в тому числі за участі вищезгаданих маркерів запалення. Імунне запалення – більш потужний

індивідуально набутий складний адаптаційний механізм, який зазвичай у нормі приводить до елімінації чужорідного та шкідливого антигену [24].

Важливою фазою запалення є його гальмування та припинення, що необхідні для попередження ушкодження здорових клітин. Активно гальмує запалення та стимулює розвиток сполучної тканини трансформуючий фактор росту- β , який вважають протизапальним цитокіном. Подібними ефектами володіють також тромбоцитарний і фібробластний фактори росту. Сильний інгібуючий ефект виявляє ендогенний глюкокортикоїд кортизон – гормон кори наднирників. Крім того надлишкова активність прозапальних цитокінів зазвичай урівноважується супресорами цитокінової системи, за умов дефіциту яких запалення стає дуже важким, а при відсутності – смертельним. Протизапальна активність виявлена у інтерлейкінів-1 α , -4, -10, 13, інтерферону- α . Катехоламіни та глюкокортикоїди інгібують продукцію прозапальних цитокінів (інтерферону- γ , фактору некрозу пухлин- α , інтерлейкіну-12), стимулюють протизапальні – інтерлейкіни -4, -10 і трансформуючий фактор росту- β . Статеві гормони знижують вплив цитокінів: естрадіол – Т-хелпер-1-, а тестостерон – Т-хелпер-2-залежних. Сукупність усіх цих регуляторів підтримує баланс про- та антизапальних факторів, попереджує прогресію та перехід від гострого до хронічного запалення. Останнім захисним рубежем є апоптоз, який усуває скупчення агресивних запальних та уражених клітин. Якщо ж припинення запального процесу не відбувається, то запалення переходить у хронічну форму [21].

Хронічне запалення тривалий патологічний стан, що характеризується посиленою інфільтрацією лейкоцитів (моноцитів, макрофагів, лімфоцитів і плазматичних клітин), руйнуванням тканин і фіброзом. Негативні наслідки хронічного запалення пов'язані в основному з надмірним утворенням вільних радикалів і виснаженням системи антиоксидантного захисту [25].

Вільні радикали – будь-які хімічні речовини, які містять неспарені електрони. Неспарений електрон зазвичай справляє високу реактивну здатність. Шкідливий вплив та біологічну шкоду, заподіяну активними формами кисню та

азоту називають оксидативним/нітрозативним стресом [26]. Негативні побічні наслідки відбуваються тоді, коли є дисбаланс між продукцією активних форм кисню/азоту та зменшенням антиоксидантних молекул у організмі. Відомо, що активні форми кисню та азоту відіграють подвійну роль у організмі, спричиняючи корисні та шкідливі ефекти [27]. Прикладом позитивного ефекту може бути участь низьких концентрацій цих молекул у захисті від патогенних мікроорганізмів. Надлишок синтезу вільних радикалів призводить до пошкодження та порушення нормального функціонування ліпідів, білків і ДНК, що є токсичним для клітин і тканин [28]. Активні форми кисню (АФК) можуть утворюватись з ендогенних та екзогенних клітинних субстанцій. Потенційними ендогенними постачальниками можуть бути мітохондрії, цитохром P₄₅₀, пероксисоми та активовані запальні клітини [29]. Мітохондрії – основні клітинні органели, які продукують вільні радикали. Мітохондрії споживають до 90 % клітинного кисню та є найбільш уразливими до окисного пошкодження органелами клітин [28]. Додатковими ендогенними продуцентами АФК є нейтрофіли, еозинофіли та макрофаги. Активовані макрофаги збільшують споживання кисню та продукують АФК, зокрема O₂[•], оксид азоту та H₂O₂ [30]. Крім того запальні клітини сприяють посиленню синтезу активних форм кисню та азоту шляхом продукції цілого ряду прозапальних цитокінів, які здатні активувати вільнорадикальні реакції та індукцибельну синтазу оксиду азоту в багатьох клітинах [6, 31, 32, 33, 34].

Відомо, що клітинна мембрана є однією з найбільш чутливих ділянок до пошкодження АФК. Вільні радикали можуть активувати процеси перекисного окислення ліпідів, накопичення продуктів яких може призводити до продукції канцерогенів, таких як диальдегід [35], та порушувати плинність і еластичність мембран [36]. Іншою основною мішенню вільних радикалів є білки, з амінокислотами яких вони можуть вступати в реакцію, порушуючи при цьому функціонування важливих клітинних і позаклітинних молекул [28]. ДНК є також дуже чутливими до впливу вільних радикалів, взаємодія з якими може

призвести до пошкодження ланцюгів, що в свою чергу за певних умов може бути смертельним для організму [37].

З метою уникнення шкідливого впливу вільних радикалів у тканинах і клітинах функціонує системи репараційного та антиоксидантного захисту. Механізми захисту від оксидативного стресу можна розділити на антиоксиданти, репараційні та фізичні бар'єри. Багато ферментів беруть участь у нейтралізації вільних радикалів, в тому числі глутатіонпероксидази, супероксиддисмутази та каталази. Крім того існує низка сполук неферментативної природи, які залучаються до захисту від оксидативного стресу. До них відносяться аскорбінова кислота, альфа-токоферол, відновлений глутатіон, каротиноїди, флавіноїди та інші. В нормі існує чіткий баланс між продукцією вільних радикалів і антиоксидантних молекул у клітині, але в умовах окисного стресу баланс порушений в сторону надмірної кількості вільних радикалів. Важливою складовою системи антиоксидантного захисту є глутатіонзалежна ланка. Глутатіон вважається найпотужнішим, універсальним і важливим антиоксидантом у організмі. Глутатіон є кофактором для інших ферментів детоксикації, таких як: глутатіонпероксидази та глутатіонтрансферази, безпосередньо знешкоджує синглетний кисень і гідроксильні радикали, а також залучений до механізмів репарації та експресії ДНК [38].

Таким чином, запалення є первинною реакцією організму, спрямованою на усунення чужорідних антигенів, відновлення клітин і тканин [39]. Під час запалення відбувається синтез великої кількості медіаторів та генерація активних форм кисню та азоту [40]. Хронічне запалення може призводити до зниження антиоксидантного захисту, розвитку оксидативного стресу, пошкодження клітин або клітинної гіперплазії, а також сприяти злоякісному пухлинному росту. З огляду на це, запалення вважається одним з основних попередників розвитку раку [41, 42]. Для подальшого з'ясування взаємозв'язку між хронічним запаленням і раком потрібно розглянути молекулярно-біохімічні механізми канцерогенезу та визначити в них роль запалення.

1.2. Біохімічні основи канцерогенезу, індукованого запаленням

Наявність лейкоцитів у пухлині, спостерігав ще в 19 ст. Рудольф Віхров, що дозволило вперше припустити про наявність можливого зв'язку між запаленням і раком. Проте, лише в останні десять років вченими були отримані чіткі докази того, що запалення відіграє важливу роль у канцерогенезі [8, 6, 11]. Було підраховано, що хронічні інфекції та викликане ними запалення спричиняють приблизно чверть всіх випадків захворювання на рак в усьому світі [11, 43]. Запальний процес впливає на розвиток пухлин на різних стадіях за рахунок посилення продукції цілого ряду медіаторів запалення: цитокінів, простагландинів, хемокінів і факторів ангіогенезу, а також активних форм кисню та азоту та активації генів, які регулюють проліферацію, апоптоз і канцерогенез [44, 45].

Ініціація пухлинного процесу відбувається внаслідок мутацій у нормальних клітинах, які спричиняють їх неконтрольований поділ та виживання. Однак у більшості випадків однієї мутації недостатньо – багатьом видам раку потрібно щонайменше чотири або п'ять мутацій [46]. Існує припущення, що запальне мікрооточення може збільшувати частоту мутацій. Активовані запальні клітини є джерелом активних форм кисню та азоту, які здатні викликати пошкодження ДНК і геномну нестабільність. У дослідженнях Kraus and Arber [47] були показані мутації p53 у пухлинних і запалених клітинах, імовірно викликані окисним пошкодженням, та висловлено припущення про те, що запалення є причиною зміни геному. Крім того, прозапальні цитокіни можуть підвищувати кількість активних форм кисню та азоту в передракових клітинах. До того ж запалення може призводити до епігенетичних змін, які сприяють ініціюванню пухлин. В свою чергу пухлиноасоційоване запалення сприяє подальшій продукції цитокінів і активних форм кисню та азоту [8].

Індукований запаленням мутагенез може призводити до інактивації або репресії репарації генів, а АФК можуть спричиняти пряму окисну інактивацію ферментів, яка не підлягає відновленню [48, 49].

Іншим механізмом, за допомогою якого запалення може сприяти ініціації пухлин, є посилення продукції факторів росту та первинних прозапальних цитокінів, а також активне залучення факторів транскрипції NF-κB та STAT3, на які сходяться більшість онкогенних сигнальних шляхів [34, 50, 51].

Зв'язок між ініціацією пухлин і запаленням не односпрямований, адже є докази того, що пошкодження ДНК може призводити до розвитку запалення і тим самим сприяти канцерогенезу [52, 53]. Прикладом такого впливу може бути показана Mantovani A. [7] активація сигнальних шляхів, які посилюють продукцію прозапальних цитокінів і хемокінів, онкобілками Ras, Muc, RET.

Прогресування раку – процес пов'язаний з ростом пухлини від однієї ініційованої клітини до розвиненої пухлини. Стимуляція пухлинного росту обумовлена посиленням проліферації клітин та зменшення рівня їх смерті, які стимулюються керованими запаленнями механізмами [34]. Чисельні механізми, за допомогою яких запалення спричиняє розвиток пухлин, можуть також посилювати ангиогенез, що збільшує кровопостачання та сприяє наступній фазі росту пухлин [54].

Одним з основних механізмів сприяння пухлинного росту є посилення продукції стимулюючих пухлину цитокінів імунними/запальними клітинами, що активують фактори транскрипції NF-κB, STAT3, AP-1 у передракових пухлинах, які залучені до активації проліферації та виживання клітин. NF-κB та STAT3 активуються при багатьох ракових захворюваннях і діють як неklasичні онкогени, в свою чергу активуючи гени, які контролюють виживання клітин, проліферацію та ріст, а також ангиогенез, інвазивність і рухливість [55, 56].

Окрім вирішальної ролі в сприянні пухлинного росту та запаленню деякі цитокіни та вищезгадані фактори транскрипції можуть також пригнічувати розвиток запалення і ріст пухлин [57, 58]. Крім того NF-κB та STAT3 можуть посилювати стійкість пухлинних клітин до стресу та травми, активувати антимікробні білки, антиоксиданти та білки теплового шоку [34, 59].

З клінічної точки зору одним з найбільш важливих аспектів канцерогенезу є метастазування, адже 90 % смертності від раку спричиняється метастазами.

Останні дослідження однозначно показують, що метастазування обумовлене тісним взаємозв'язком між раковими, імунними та запальними клітинами, а також стромальними елементами. Процес метастазування починається з набуття пухлинними клітинами фіброblastних властивостей, які збільшують їх рухливість і дозволяють їм проникати крізь епітільний шар/базальні мембрани та досягати еферентних або лімфатичних судин [60]. Наступним етапом є потрапляння пухлинних клітин до кровоносних і лімфатичних судин, чому може сприяти запалення через продукцію посередників, які збільшують проникність судин. Відомо, що лише близько 0,01 % пухлинних клітин, які потрапляють в обіг, виживають та спричиняють мікрометастази [61]. Після екстравазації циркулюючі пухлинні клітини починають розмножуватись, взаємодіючи при цьому з імунними, запальними та стромальними клітинами [62]. На цьому етапі метастазуванню сприяють деякі прозапальні цитокіни, зокрема фактор некрозу пухлин- α , синтезований макрофагами [63]. Трансформуючий фактор росту- β протизапальний цитокін, підвищений рівень якого часто асоціюється з поганим прогнозом, регулює епітеліально-мезенхімальний перехід та метастази ракових клітин, активує SMAD транскрипційний фактор і MAP-кінази, які в свою чергу контролюють експресію інших важливих регуляторів цього етапу [64]. Крім того, вторгнення пухлинних клітин вимагає великого протеолізу позаклітинного матриксу, тому запальні клітини є важливими джерелами протеаз [8].

Таким чином, запалення відіграє одну з визначальних ролей на всіх етапах канцерогенезу, сприяючи за рахунок багатьох складних механізмів ініціації, росту та метастазуванню пухлин. Крім того запалення, імунітет і рак знаходяться у взаємозалежних відносинах, що ускладнює з'ясування причинно-наслідкового зв'язку між цими процесами. Одним з головних уроків, які можна взяти з дослідження відносин між запаленням і раком є те, що більшості видів раку можна запобігти. Тому на сьогодні профілактика залишається головним ефективним способом боротьби з раком.

1.3. Причини, механізми та наслідки розвитку запалення при тривалій шлунковій гіпоацидності

З'ясування причин і механізмів розвитку запальних процесів у травному тракті є надзвичайно актуальним, оскільки запалення розглядається одним з важливих факторів ризику розвитку раку [3, 8], в тому числі в шлунково-кишковому тракті [4, 5, 47]. Крім того, на сьогодні доведений також тісний взаємозв'язок між раком та інфекцією [12, 65], тому травний тракт, який контактує з великою кількістю чужорідних агентів, має особливі специфічні та неспецифічні механізми захисту. Однією з таких важливих неспецифічних ланок захисту є кисле середовище в шлунку, яке руйнує більшість шкідливих мікроорганізмів. Пригнічення секреції соляної кислоти в шлунку може мати цілу низку негативних наслідків, зокрема розвиток гіпергастринемії, анемії, дефіциту вітаміну В12, заліза, кальцію та порушення мікробіоценозу в травному тракті [1]. Всі ці наслідки можуть також призводити до розвитку запалення.

Основним потужним активатором запального процесу в травному тракті є надмірний бактеріальний ріст, який спостерігається за умов тривалого зниження кислотності в шлунку. Так в серії досліджень на мишах Zavros та співавт. [66, 67] показали, що генетична та хімічна гіпохлоргідрія сприяє надмірному шлунковому росту не-*H. pylori* бактерій, що в подальшому призводить до запалення. Так як при цьому не були присутні ні *H. pylori*, ні інші уреазу продукуючі штами *Helicobacter*, автори заключили, що не-*H. pylori* бактерії викликають запалення слизової оболонки шлунка. Більш того, автори продемонстрували, що оральне зараження чи *H. pylori*, чи *Acinobacter lwofii* мишей викликає схоже збільшення рівня гастрину в плазмі крові, схожі нейроендокринні зміни в слизовій оболонці шлунка і надзвичайно схожі процеси запалення в слизовій шлунка [66, 67]. Всі ці результати вказують на те, що гастрити та гіпергастринемія не є специфічними для *H. pylori*, вони також можуть бути викликані іншими грам-негативними бактеріями. Звідси витікає

заключення, що запалення в шлунку, фактично, представляє собою загальну відповідь слизової на бактеріальну колонізацію.

На сьогодні відомо, що за умов тривалої шлункової гіпоацидності крім дисбактеріозу викликати розвиток запалення може гіпергастринемія [68]. Гастрин – гормон шлунково-кишкового тракту, який відіграє важливу роль у регуляції секреції соляної кислоти шляхом стимуляції через ССК-2 рецептори парієнтальних клітин шлунка як безпосередньо, так і через гістамін, синтезований ентерохромофінними клітинами [69, 70]. Загальновідомо, що гістамін є одним з загальних медіаторів гострої запальної реакції, який здатний активувати лейкоцити, в тому числі за умов гіпергастринемії [71, 72]. Гастрин може впливати на ендотеліальні клітини, внаслідок чого останні змінюють експресію молекул адгезії та збільшують секрецію хемокинів [73, 74]. Крім того, показано наявність ССК-В рецепторів у поліморфноядерних лейкоцитах кишечника та мононуклеарів периферичної крові [75, 76] та взаємозв'язок між секрецією гастрини та прозапальних цитокінів [77, 78, 79].

Таким чином, хронічний запальний процес, який розвивається в наслідок гіпергастринемії та порушення мікробіоценозу в травному тракті за умов тривалої шлункової гіпоацидності через низку вищезгаданих у пунктах 1.1. і 1.2. механізмів може спричиняти пошкодження слизових оболонок і сприяти канцерогенезу.

РОЗДІЛ 2

МЕХАНІЗМИ ДІЇ ТА ОСОБЛИВОСТІ ЗАСТОСУВАННЯ ПРОБІОТИКІВ

2.1. Молекулярно-біохімічні механізми дії пробіотиків

Термін «пробіотик» вперше був використаний у 1965 році для опису речовини, яку виділяє один організм для стимуляції росту іншого [17]. На сьогодні, пробіотиками називають живі мікроорганізми, які чинять позитивний вплив на здоров'я організму-хазяїна, в тому числі на шлунково-кишковий тракт [80]. Вважають, що ефект впливу пробіотиків тісно пов'язаний з приживленням введених бактерій-симбіонтів на слизовій оболонці, а також з особливостями їх біологічної, антагоністичної та імуномодуючої активності [81-83]. Позитивний вплив живих пробіотичних бактерій на організм може бути пов'язано як з їх імуномодуючими властивостями, так і з конкуренцією за поживні речовини та рецептори адгезії на епітелії; пригніченням росту патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів у результаті синтезу різних бактерицидних і бактеріостатичних речовин, інактивації та попередження потрапляння токсинів із просвіту кишечника до системного кровообігу [84].

Важливим механізмом дії пробіотиків є їх взаємодія з образрозпізнаючими рецепторами епітеліальних та імунокомпетентних клітин, зокрема з Toll-подібними рецепторами (TLR – Toll-like receptors). На сьогодні відомо три родини образрозпізнаючих рецепторів: NOD-, манозо-лектинові рецептори та TLR. NOD-рецептори розпізнають, як правило, патогенні мікроорганізми. Всі три типи рецепторів є сигнальними та розпізнають ліганди, які належать переважно мікроорганізмам і вірусам, запускають каскад реакцій, що забезпечують передачу сигналу до ядра імунокомпетентної клітини [85, 86]. Передача сигналу від усіх цих рецепторів відбувається з використанням адапторної молекули MyD88 і транскрипційного фактору NF- κ B, та спричиняє продукцію цілого спектру різних медіаторів: про- та протизапальних цитокінів, інтерферонів, катіонних протимікробних пептидів, стимуляцію процесів

регенерації, апоптозу тощо. Транскрипційний фактор NF-κB представлений групою консервативних плазматичних білків, які містяться в усіх клітинах організму. При стимуляції ці білки переміщуються до ядра, де зв'язуються з промоторними ділянками багатьох генів, забезпечуючи їх експресію. Мішенями служать гени, що кодують синтез інтерлейкінів -1, -2, -6, -8, -12, фактора некрозу пухлин-α (ФНП- α), гранулоцитарно-макрофагального фактору (ГМ-КСФ), інтерферону-γ, а також адгезивних молекул міжклітинної взаємодії, білків гострої фази, синтази оксиду азоту, циклооксигенази-2, β-дефензинів, молекул головного комплексу гістосумісності та регуляторів апоптозу [87]. Слід відмітити, що прозапальні цитокіни володіють багатофакторною дією по відношенню до цілого ряду клітин: лейкоцитів, клітин центральної нервової системи, ендотелію судин, печінки та ін., та при підвищеній концентрації можуть викликати метаболчні, гормональні та нейроендокринні ефекти [87, 88].

TLR виявлені в клітинах епітелію, ендотелію, моноцитах і макрофагах, поліморфно-ядерних лейкоцитах, дендритних клітинах, тобто в клітинах, які в першу чергу зустрічаються з чужорідними агентами. У людини ідентифіковано 11 TLR, які розпізнають переважно екзогенні та деякі ендогенні молекулярні структури. Встановлено, що:

- TLR1 формує гетеродимери з TLR2 та розпізнає триацилові ліпопептиди;
- TLR2 у взаємодії з TLR1 розпізнає пептидоглікан, ліпопептиди та ліпопротеїди грампозитивних бактерій, ліпопротеїди мікоплазм і зимозан дріжджових грибів;
- TLR3 розпізнає дволанцюгову РНК;
- TLR4 разом з позаклітинними білками MD2, CD14 і LBP розпізнає бактеріальні ліпополісахариди;
- TLR5 розпізнає бактеріальні флагеліни;
- TLR6 в асоціації з TLR2 впізнає діацилові ліпопептиди;
- TLR7 і TLR8 розпізнають одноланцюгову РНК;
- TLR9 – неметильовані дезокситидил-фосфатдезоксигуанозин-структури;
- Ліганди TLR10 і TLR11 поки не ідентифіковані.

Після ліганд-рецепторного контакту поадьший шлях є загальним для більшості клітинно-опосередкованих процесів. Цей шлях включає взаємодію з протеїном MyD88. Подальша передача сигналу відбувається через протеїнкіназу IRAK, яка асоційована з IL-1R та через фактор TRAF6, асоційований з рецептором ФНП- α . Це викликає активацію фактора NF- κ B і MAP-кінази, що призводить до експресії вищезазначених біологічно активних молекул. Сукупність TLR та інших рецепторів забезпечує розпізнавання ряду консервативних структур мікроорганізмів і вірусів, розвиток реакцій вродженого та набутого імунітету [85, 86]. Порівняно нещодавно показано, що імунна система кишечника в нормі розпізнає та відповідає на антигени нормальної мікрофлори та мікрофлора впливає на експресію генів у клітинах, які презентують антигени [89].

Встановлено, що розпізнавання коменсальної мікрофлори TLR відбувається за фізіологічних умов, а також що цей процес потрібен для підтримки кишечного гомеостазу та захисту від інфекцій [90].

Існують певні відмінності між різними пробіотичними мікроорганізмами та штамами в механізмах дії. До загальних механізмів дії пробіотиків можна віднести: антимікробну активність (зменшення рН просвіту, секрецію антимікробних пептидів, зменшення бактеріальної інвазії, блокування бактеріальної адгезії на епітеліальних клітинах), зростання бар'єрної функції (підвищення виробництва слизу та цілісності бар'єрів), імуномодулюючу (вплив на епітеліальні та дендритні клітини, моноцити/макрофаги, лімфоцити, природні кіллери, Т-клітини та їх баланс) [91].

Одним з механізмів, за допомогою якого пробіотики перешкоджають колонізації патогенних бактерій є здатність знижувати рН просвіту травного тракту та продукувати антимікробні субстанції – бактеріоцини і дефензини [92, 93, 94]. Крім пригнічення росту патогенних мікроорганізмів пробіотики можуть підвищувати бар'єрну функцію слизових оболонок шлунково-кишкового тракту шляхом можливої модуляції процесів пов'язаних зі збереженням

цитоскелету, зміцнення контактів епітеліальних клітин та секреції слизу, хлориду та води [95, 96].

Пробіотики здатні взаємодіяти з епітеліальними клітинами на рівні сигнальних шляхів і через TLR активувати продукцію захисних цитокінів, які підвищують регенерацію і гальмують апоптоз епітеліальних клітин [96, 97, 98]. У дослідженнях Yan F. [97] було продемонстровано запобігання цитокін-індукованого апоптозу епітеліальних клітин у присутності *Lactobacillus rhamnosus GG* шляхом активації антиапоптичної Akt/протеїнкінази-В та інгібування активації проапоптичної p38/мітоген-активованої протеїнкінази на ФНП- α , інтерферон- γ чи інтерлейкін-1. Крім того, на відміну від патогенних бактерій пробіотичні мікроорганізми можуть зменшувати прозапальну відповідь шляхом запобігання деградації регуляторного фактору ІкВ, в результаті чого відбувається послаблення NF-кВ опосередкованої експресії запальних генів [99].

Позитивний вплив на імунну систему – один з найбільш цікавих та перспективних пробіотичних ефектів. Відома здатність окремих штамів лактобацил, пропіоновокислих бактерій і ббіфідобактерій, які використовуються в складі пробіотиків, підвищувати фагоцитарну активність макрофагів, активувати природних кіллерів, регулювати синтез інтерлейкінів, ФНП- α , інтерферону, реакції Т-клітинного імунітету та стимулювати продукцію імуноглобулінів. Імуностимулююча функція пробіотичних бактерій зазвичай пов'язана з пептидогліканами та тейхоевими кислотами клітинних стінок, які виділяються в значних концентраціях при руйнуванні частини мікробних клітин під час транзиту пробіотиків агресивними ділянками шлунково-кишкового тракту [15, 91].

Таким чином, механізм терапевтичної дії пробіотичних препаратів може бути обумовлений ліганд-рецепторною взаємодією клітин організму з живими чи вбитими бактеріальними клітинами, їх поверхневими структурними компонентами та ДНК, з наступною активацією клітинної та гуморальної ланок

природного імунітету. Імуномодулююча активність пробіотичних препаратів залежить від виду та штаму пробіотичних мікроорганізмів.

2.2. Перспективи застосування пробіотиків

Останнім часом методи бактеріальної терапії набувають широкої популярності, у зв'язку з наявністю даних про переважно позитивний вплив на здоров'я пробіотиків, не зважаючи на обмежене розуміння механізмів їх дії. Відомо, що клінічна ефективність пробіотиків залежить від багатьох факторів: їх складу, технології виготовлення, концентрації клітин і біологічно активних компонентів, стану мікробіоценозу та імунної системи пацієнта, його віку, базової медикаментозної терапії тощо. З урахуванням цих факторів перед клініцистом стоїть складне завдання підібрати оптимальний пробіотик для тієї чи іншої клінічної ситуації [15, 100, 101].

На сьогодні спектр захворювань, за яких встановлено доцільність застосування пробіотиків, достатньо широкий завдяки інтенсивним клінічним дослідженням і включає в себе наступні патологічні стани [15, 17, 100]:

- Хвороби травного тракту (виразкова хвороба шлунка та дванадцятипалої кишки, панкреатит, холецистит, хронічні захворювання печінки та жовчовивідних шляхів, вірусні гепатити, коліт, гастрит, ентерит);
- Гострі кишкові інфекції різної етіології (шигеліоз, сальмонельоз, ешерихіоз, ротавірусний ентерит та інші);
- Захворювання дихальних шляхів (гострий і хронічний бронхіт, пневмонія тощо);
- Інфекційно-запальні захворювання урогенітального тракту;
- Ураження суглобів і сполучної тканини (ревматоїдні артрити, спондилоартрити та інші);
- Злоякісні новоутворення молочних залоз і травної системи;
- Алергії (алергодерматози, бронхіальна астма тощо);
- Дерматологічні захворювання;
- Ендокринні захворювання (діабет, тиреоїдит та інші);

- Захворювання центральної нервової системи;
- Імунні порушення, в тому числі аутоімунні захворювання;
- Стоматологічні захворювання;
- Перинатальні інфекції.

Крім того, накопичена інформація про позитивний вплив окремих пробіотиків на імунітет, процеси метаболізму, детоксикаційну функцію та інші механізми життєдіяльності організму людини дозволяє передбачити можливість раціонального застосування пробіотиків не лише як біокоректорів складу мікрофлори в окремих біотопах, а й як імуномодуляторів, стимуляторів регенерації тканин, детоксикаторів, антиоксидантів, селективних деконтамінаторів патогенної флори тощо [15].

Загальні механізми дії пробіотиків за умов різних патологічних станів представлені в табл. 2.1. [90]:

Таблиця 2.1.

Механізми дії пробіотиків за різних патологічних станів [90].

Захворювання (синдроми)	Механізм дії пробіотиків
Алергія (ураження шкіри, ревматоїдний артрит)	<i>Забезпечення захисту епітеліального бар'єру від транслокації</i>
Імунологічні порушення (імунодефіцит, реакція на вакцинацію)	<i>Взаємодія з імунокомпетентними клітинами та клітинними рецепторами</i>
Канцерогенез	<i>Інактивація мутагенів, стимуляція імунітету</i>
Запальні процеси в товстому кишечнику, хвороба Крона	<i>Зниження місцевої запальної реакції</i>
Синдром надлишкового бактеріального росту в тонкому кишечнику	<i>Антимікробна активність, конкурентне вилучення</i>
Несприйняття лактози	<i>Доставка мікробної лактази в тонкий кишечник</i>
Діареї різного походження	<i>Конкурентне вилучення, посилення імунної відповіді</i>
Вагіноз, запальні процеси сечостатевої системи	<i>Конкурентне вилучення</i>
Порушення рівня холестерину	<i>Декон'югація жовчних кислот</i>
Виразкова хвороба, викликана <i>Helicobacter pylori</i>	<i>Імуномодуляція, конкурентне вилучення</i>
Алкогольні ураження печінки	<i>Пригнічення грамнегативної мікрофлори, яка продукує ендотоксин</i>

Великої уваги також заслуговує доцільність профілактичного використання пробіотиків. У той час, коли профілактичне використання антибіотиків є дуже небажаним, то застосування для таких цілей пробіотиків на основі фізіологічної флори є дуже перспективним [15].

Окрім вищезгаданих областей застосування пробіотиків, на теперішній час вже проведені клінічні дослідження та отримані позитивні результати їх ефективності за умов запальних [101, 102] та онкологічних захворювань кишечника [19], пієлонефриту [103], інфекційного ендокардиту [104], профілактики серцево-судинних захворювань та атеросклерозу, зокрема для зниження рівня холестерину в крові [105], при інфекційній діареї у ВІЛ-інфікованих [106], профілактики карієсу [107] та нозокоміальної діареї [108], хірургічних інфекцій [109], некротичного ентероколіту новонароджених [110], кандидозної інфекції [111].

Слід також зазначити, що в області застосування пробіотиків відкривається також новий перспективний напрямок їх використання для підвищення ефективності вакцинації та зниження ризику розвитку побічних ефектів, що пов'язано з адьювантною дією пробіотичних мікроорганізмів.

Разом з тим слід визнати, що суперечливість багатьох даних, отриманих у різних дослідженнях, часто ускладнює вибір препарату та оптимального способу пробіотичної терапії для конкретного клінічного випадку [15].

Відомо, що пробіотики повинні володіти наступними властивостями [112]:

- здатністю залишатись життєздатним при проходженні шлунково-кишковим трактом (він має бути стійким до дії жовчних кислот, соляної кислоти та панкреатичних ферментів);
- здатністю до адгезії до епітелію слизової оболонки кишечника;
- можливістю колонізації кишечника чи відповідного органу-мішені;
- синтезувати антимікробні речовини, які активні проти патогенних мікроорганізмів;
- бути безпечними при застосуванні;

- зберігати свої властивості протягом певного часу при зберіганні в звичайних умовах;
- клінічно доказаною користю для здоров'я.

На теперішній час пробіотичні препарати гарно переносяться людиною та в цілому вважаються безпечними при застосуванні. Однак існує ряд теоретично можливих, негативних наслідків застосування пробіотиків, зокрема:

- Виникнення системних інфекцій;
- Негативний вплив на метаболізм;
- Надмірна стимуляція імунної системи в чутливих груп людей;
- Перенос генів резистентності до антибіотиків [15, 17, 100, 113, 114].

Сприятливими факторами виникнення вищезазначених небажаних наслідків при застосуванні пробіотиків є виражена імуносупресія, попередні тривала госпіталізація та хірургічні втручання, а головним чинником летальних випадків – важкі основні захворювання [100]. Прикладами негативних наслідків застосування пробіотиків є низка експериментальних і клінічних випробувань різних пробіотичних бактерій та їх комбінацій за умов імунодефіциту та важкого гострого панкреатиту [115]. Незважаючи на існування негативних наслідків, застосування пробіотиків для профілактики та лікування різних захворювань може мати перспективні, важливі та корисні ефекти.

Таким чином, на теперішній час у всьому світі достатньо широко розповсюджено профілактичне та терапевтичне застосування пробіотиків. Тим не менш, незважаючи на існуючі підтвердження ефективності пробіотиків при різних патологічних станах, залишається низка невирішених питань, які стосуються механізмів дії та особливостей застосування пробіотиків, зокрема:

- залишаються недостатньо вивченими механізми дії різних пробіотичних мікроорганізмів за умов багатьох захворювань;
- відсутність пробіотиків у клінічних рекомендаціях, які стосуються терапії тих нозологічних форм, при яких ефективність їх застосування доведена в рандомізованих контрольованих дослідженнях або метааналізах;

- незрозуміло, який пробіотик вибирати при конкретній нозологічній формі, адже результати досліджень *in vitro* та низки клінічних досліджень свідчать, що різні штами мікроорганізмів мають різні характеристики. Тому необхідно проведення подальших досліджень спрямованих на уточнення органоспецифічних особливостей різних пробіотиків і визначення функціонально-орієнтованого підходу до їх призначення;

- потрібно використовувати монотерапію чи комбінацію різних пробіотиків?

- яку кількість мікроорганізмів повинен містити пробіотичний препарат? Якими є оптимальна доза та режим дозування препарату для дорослих і дітей? На сьогодні відсутні дані про мінімальну ефективну дозу пробіотика, зазвичай, рекомендується добовий прийом 10^6 - 10^9 пробіотичних мікроорганізмів, однак в деяких дослідженнях пропонується більш висока доза;

- яка рекомендаційна тривалість терапії та найбільш оптимальний шлях введення пробіотиків?

Отже, за умов проведення комплексних, масштабних досліджень з вирішенням вищезазначених проблемних питань в арсеналі лікарів з'явиться новий клас ефективних та безпечних лікарських препаратів [17, 100, 101, 115].

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

РОЗДІЛ 3

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

3.1. Реактиви

У роботі було використано такі реагенти та матеріали: мультипробіотик «Симбітер® ацидофільний» концентрований (ТОВ «О.Д.Пролісок», Україна); омепразол («Sigma-Aldrich», США); диференційно-діагностичні середовища: Ендо, Плоскірева, ВСА, Сабуро, Блаурока, MRS, цитрат Симонса, жовчно-сольовий агар та кров'яний агар («Хімпомресурси», Україна); комерційні набори для визначення гастрину («MP Biomedicals, LLC», США) та ФНП- α , ІЛ-1 β , ІФН- γ , ІЛ-6 («GE Healthcare: Amersham», Великобританія); стрептоміцин, канаміцин, флуконазол («Київмедпрепарат», Україна); циклоферон (ТОВ «НТФФ Полісан», Росія); фітогемалютинін, середовище 199, Ficoll-Paque, УДФ-глюкоза, глюкозо-1,6-дифосфат, УДФ-глюкозо-пірофосфорилаза, фосфоглюкомутаза, глюкозо-6-фосфат-дегідрогеназа, HEPES, ЕДТА, НАДФН, тетразолій нітросиній, альбумін сироватки бика («Sigma-Aldrich», США); 1-хлор-2,4-динітробензол, глутатіон відновлений та окислений, ортофталевий альдегід, дезоксихолат та саліцилат натрію («Fluka», Німеччина).

Інші реактиви та органічні розчинники кваліфікації х.ч. або ч.д.а. («Хіммед», «Альфарус», Україна).

Для приготування водних розчинів та середовища інкубації використовували дистильовану воду.

3.2. Умови проведення експерименту

Дослідження проведені на білих нелінійних щурах-самцях вагою 160-180г, які були розділені на чотири групи по 10 тварин в кожній. Маніпуляції з тваринами та їх утримання в віварії здійснювались з дотриманням нормативів міжнародних рекомендацій та національного законодавства про проведення медико-біологічних досліджень [116, 117].

Контролем (I група) слугували щурі, яким упродовж 28 днів вводили 0,2 мл внутрішньочеревинно (в/о) та 0,5 мл перорально воду для ін'єкцій. Щурам II групи перорально вводили мультипробіотик «Симбітер®» ацидофільний концентрований (СИМ) (виробництва ТОВ «О.Д. Пролісок», Україна) в дозі 0,14 мл/кг, який був розчинений у 0,5 мл води для ін'єкцій. Гіпоацидний стан у щурів (III група) моделювали щоденним введенням протягом 28 днів омепразолу (ОМ) (виробництва «Sigma-Aldrich», США), який є блокатором H^+K^+ -АТФази-ферменту, що приймає участь у синтезі соляної кислоти парієтальними клітинами шлунку. ОМ вводили в/о один раз на добу в дозі 14 мг/кг, який був розчинений в 0,2 мл води для ін'єкцій. Щурам IV групи одночасно з введенням ОМ вводили мультипробіотик СИМ, який містить 14 унікальних пробіотичних штамів біфідобактерій, лактобацил, лактококів та пропіоновокислих бактерій та фізіологічно корисних продуктів їх метаболізму. В 10 мл СИМ міститься не менше 10^9 живих клітин. За добу до проведення експерименту тварини мали доступ лише до води. Щурів умертвляли методом дислокації шийних хребців через добу після останнього введення препаратів, відбирали кров, тимус, селезінку, зразки слизових оболонок шлунка, тонкого та товстого кишечника.

3.3. Отримання сироватки крові, лімфоїдних клітин тимуса та селезінки, зразків слизових оболонок шлунка та товстого кишечника

Після смерті тварин відбирали з серця кров у центрифужні пробірки без антикоагулянту для отримання сироватки, вилучали зразки слизових оболонок шлунка та товстого кишечника, а також тимус і селезінку, які поміщали в чашки Петрі з охолодженим середовищем 199 («Sigma-Aldrich», США).

Відібрану кров для осадження грубодисперсних білків інкубували одну годину у термостаті при $+37,0^{\circ}C$. Потім цільну кров відділяли по стінках пробірки пастерівською піпеткою та центрифугували при 1500 об./хв протягом 10-15 хв до утворення чіткої межі між сироваткою та форменими елементами крові. Сироватку відбирали в окремі мікропробірки для одноразового використання та заморожували при $-20,0^{\circ}C$ [118].

Для отримання клітинної суспензії тимус і селезінку звільняли від прилеглих тканин та гомогенізували за допомогою скляного гомогенізатора Поттера в охолодженому безкольоровому розчині Хенкса. Суміш фільтрували через чотири шари стерильної капронової сітки. Суспензії спленоцитів та тимоцитів за методом [119] нашаровували на градієнт Ficoll-Paque («Sigma-Aldrich», США), щільність ($d=1,077$) у співвідношенні 3:5. Центрифугували протягом 30-40 хв при 1500 об/хв. Після центрифугування відбирали суспензію клітин, яка знаходилась на інтерфазній поверхні. Одержану таким чином суспензію мононуклеарних клітин двічі відмивали безкольоровим розчином Хенкса центрифугуючи протягом 5 хв при 1500 об/хв та ресуспендували в середовищі культивування (DMEM/F12, 10% ембріональної телячої сироватки, 2мМ L-глутаміну, 100 од/мл пеніциліну, 100 мкг/мл стрептоміцину та канаміцину, 10 мкг/мл флуконазолу). Далі проводили підрахунок кількості клітин в камері Горяєва, паралельно з яким визначали життєздатність лімфоцитів шляхом фарбування мертвих клітин трипановим синім. Для цього перед підрахунком 0,1 мл. виділених лімфоцитів додавали до 0,1 мл 0,2 % розчину барвника та інкубували 10 хв у термостаті при $+37^{\circ}\text{C}$. Життєздатність лімфоцитів в межах 80-90 % вважали задовільною. Клітинну суспензію доводили середовищем культивування до щільності 5×10^6 клітин в 1 мл, фасували та заморожували в рідкому азоті для подальших досліджень.

3.4. Аналіз видового і кількісного складу мікрофлори слизових оболонок шлунка та товстого кишечника

Аналіз видового та кількісного складу мікрофлори слизової оболонки шлунка та товстого кишечника проводили шляхом висіву 1 мл з 10-кратного розведення кожного зразка слизової оболонки шлунка та фекальних мас на диференційно-діагностичні середовища: Ендо, Плоскірева, ВСА для виявлення патогенних ентеробактерій, жовтково-сольовий агар та середовище Сабуро для визначення стафілококів та грибів; сеередовище Ендо та цитрат Симонса для визначення кишкової палички та умовно-патогенних ентеробактерій; 5 %

кров'яний агар та середовище Ендо для визначення ентерококів; середовище Блаурока для біфідобактерій та середовище MRS для лактобацил.

Проведення аналізу та облік результатів при дослідженні мікробіоценозу здійснювали згідно наказу № 535 МОЗ СРСР від 1985р та наказу № 59 МОЗ України від 2003р.

Кількісні показники росту мікробних клітин виражались в десятинних логарифмах колонієутворюючих одиниць на 1 г взятого матеріалу (lg КУО/г).

3.5. Визначення концентрації гастрину в сироватці крові

Гастрин визначали радіоімунологічним методом із використанням аналітичного набору фірми "MP Biomedicals, LLC" (США). Принцип методу полягає у визначенні концентрації циркулюючого сироваткового гастрину за рахунок його зв'язування з радіоактивноміченими (^{125}I) антитілами, внаслідок чого реєструється збільшення рівня радіоактивності.

Аналіз всіх зразків сироватки крові та стандартних проб проводили у двох повторях. В пробірки паралельно вносили по 200 мкл 20 зразків стандарту гастрину для побудови калібрувального графіку та дослідних зразків сироватки крові щурів, додавали до всіх пробірок по 100 мкл розчину з міткою та відкладали контрольні пробірки до визначення радіоактивності. В усі інші пробірки додавали 100 мкл антисироватки до гастрину та інкубували протягом 2 годин при кімнатній температурі. Потім додавали до всіх пробірок 1 мл преципітуючої антисироватки, ресуспендували та центрифугували при 1500 об/хв протягом 15 хв, після чого зливали супернатант та вимірювали радіоактивність осаду за допомогою гамма-лічильника («Beckman Coulter - 5500 Gamma Counter», США). Будували калібрувальний графік, шляхом інтраполяції за стандартною кривою визначали концентрацію гастрину, яку виражали в пг/мл сироватки крові.

3.6. Визначення концентрації прозапальних цитокінів в сироватці крові

Концентрацію інтерферона- γ , фактора некрозу пухлин- α , інтерлейкінів-1 β та 6 в сироватці крові щурів визначали імуноферментним методом за допомогою комерційних наборів («GE Healthcare: Amersham», Великобританія) [120]. Для цього в лунки імунологічних планшетів (96 лунок), які попередньо іммобілізовані антитілами до цих цитокінів, вносили 50 мкл досліджуваного зразка сироватки крові та паралельно в окремі лунки вносили 50 мкл рекомбінантного стандарту відповідного цитокіну для побудови калібрувального графіку. Потім в усі лунки додавали стандартний розчинник, що містить 0,1 % азид натрію, та інкубували при 25° С протягом 1 год. Після інкубації лунки 3 рази промивали буфером для відмивання, вносили антитіла мічені біотином по 100 мкл в кожен лунку та інкубували при 25° С протягом 30 хв. Далі лунки 3 рази промивали буфером для відмивання, вносили по 100 мкл розчину стрептовідин-пероксидази хрому та інкубували при 25° С протягом 30 хв. Потім 3 рази промивали буфером для відмивання, вносили до кожної лунки по 100 мкл тетраметилбензидин-субстрату та інкубували в темряві при 25° С протягом 30 хв. Після інкубації зупиняли реакцію шляхом внесення в кожен лунку 100мкл стоп-реагенту, що містив 0,18 М сульфатної кислоти, та вимірювали абсорбцію на рідері (ELx800, Bio-Tek Instruments, США) при 450 і 550 нм. При обрахуванні враховували поправку на оптичну похибку планшета, шляхом віднімання показників при 550 нм від показника при 450 нм. Концентрацію цитокінів вираховували за калібрувальним графіком, побудованим за рекомбінантним стандартом. Всі зразки були проаналізовані в трьох повторах. Концентрацію цитокінів виражали в пг/мл сироватки крові.

3.7. Визначення вмісту нітрит-іонів у сироватці крові

Вміст нітрит-іонів визначали методом Гріса з модифікаціями за [121]. До 200 мкл сироватки вносили 200 мкл 4 % розчину їдкого натрію, інкубували, перемішуючи, на льодяній бані протягом 10 хв, а потім додавали 400 мкл

дистильованої води та 1,2 мл 4 % сірчаноокислого цинку. Витримували на льодяній бані 10 хв та центрифугували протягом 20 хв при 0 - +4°C зі швидкістю 15000 об/хв. Відбирали 1,4 мл супернатанту, додавали 1,4 мл реактиву Гріса, що складався із суміші 1:1 0,1 % розчину альфа-нафтилетилендіаміну на 5 %-ій ортофосфорній кислоті та 1 % розчину сульфанілової кислоти на 5 %-ій ортофосфорній кислоті. Пробу інкубували 10-15 хв у темному місці. Вимірювали екстинцію при 550 нм. Вміст NO_2^- визначали по калібрувальному графіку, який був побудований при використанні різних концентрацій NaNO_2 .

3.8. Визначення активності синтази оксиду азоту та вмісту нітрит-іонів у тимоцитах, спленоцитах, слизових оболонках шлунка і товстого кишечника

Активність синтази оксиду азоту (КФ 1.14.13.39) вимірювали за методом [122], який полягає у визначенні приросту продуктів аеробного окислення оксиду азоту. Інкубаційне середовище містило 2,5 мл 0,1 М тріс-НСІ буферу, рН 7,4, що містило 10 мМ хлористого кальцію, додавали 0,3 мл 320 мкМ водного розчину аргініну і 0,1 мл 1 мМ водного розчину НАДФН⁺. Реакцію запускали внесенням 0,5 мл гомогенату клітин і слизових оболонок. Пробу перемішували й одразу відбирали аліквоту 0,2 мл для визначення вмісту продуктів аеробного окислення оксиду азоту. Решту проби інкубували 30 хв при 37° С. Реакцію зупиняли внесенням 0,02 мл 0,02 % водного розчину азиду натрію.

Для визначення вмісту продуктів аеробного окислення оксиду азоту Відібрану аліквоту вносили в 1,8 мл дистильованої води, додавали 0,2 мл 1% розчину сульфанілової кислоти в 5 % розчині фосфорної кислоти. Залишали на 7 хв в темному місці при кімнатній температурі. Додавали 0,2 мл 1 % водного розчину альфа-нафтилетилендіаміну, перемішували, залишали в темному місці при кімнатній температурі на 10 хв. Після цього вимірювали екстинкцію на спектрофотометрі при довжині хвилі 539 нм.

Активність синтази оксиду азоту розраховували за формулою:

$$E = \frac{C \times 82}{N \times 30xv}, \text{ де:}$$

C – приріст вмісту NO_2 , нмоль/мл;

N – вміст білку, мг/мл.

Вміст нітрит-іонів визначали методом Гріса [121] з модифікаціями.

До 0,2 мл гомогенату клітин і слизових оболонок додавали 1,8 мл дистильованої води, 0,2 мл 1 % розчину сульфанілової кислоти в 5 % розчині фосфорної кислоти. Залишали на 7 хв в темному місці при кімнатній температурі. Додавали 0,2 мл 1 % водного розчину альфа-нафтилетилендіаміну, перемішували, залишали в темному місці при кімнатній температурі на 10 хв. Після цього вимірювали екстинкцію на спектрофотометрі при довжині хвилі 539 нм. Вміст NO_2^- визначали по калібрувальному графіку, який був побудований при використанні різних концентрацій NaNO_2 .

3.9. Визначення вмісту ТБК-активних продуктів

Вміст ТБК-активних продуктів оцінювали згідно методу Стальної [123], який полягає в тому, що при температурі кипіння у кислому середовищі малоновий диальдегід реагує з 2-тіобарбітуровою кислотою, утворюючи при цьому забарвлений триметиновий комплекс з максимумом поглинання при $\lambda=532$ нм.

Аліквоту сироватки, клітинної суспензії чи гомогенату слизових оболонок (0,5 мг білка) вміщували у буфер: 175 мМ KCl , 25 мМ трис- HCl , рН=7,4; об'єм проби становив 0,5 мл. До проби відразу додавали 0,2 мл 20 % трихлороцтової кислоти (ТХО), денатурований білок осаджували центрифугуванням при 1000 g протягом 15 хв.

До 0,5 мл отриманого супернатанту додавали додавали 0,25 мл 0,8 % тіобарбітурової кислоти (ТБК), суміш інкубували на киплячій водяній бані протягом 10 хв для розвитку забарвлення. Визначення забарвлення проводили на спектрофотометрі (СФ-46, ЛОМО, Росія) при $\lambda=532$ нм.

Вміст ТБК-активних продуктів на 1 мг білка розраховували на основі значення молярного коефіцієнта екстинкції комплексу малонового діальдегіду з 2-тіобарбітуровою кислотою: $\varepsilon = 1,56 \times 10^5 \text{ см}^{-1} \times \text{М}^{-1}$.

3.10. Визначення активності супероксиддисмутази

Активність супероксиддисмутази (КФ 1.15.1.1) у клітинах визначали за Чеварі та співавт. [124]. Метод базується на здатності супероксиддисмутази конкурувати з нітросинім тетразолієм (НСТ) за супероксидні аніони, що утворюються в результаті аеробної взаємодії відновленої форми нікотинамідаденіндинуклеотида та феназинметасульфата (ФМС). В результаті цієї реакції НСТ відновлюється з утворенням гідрозинтетразолію. У присутності супероксиддисмутази процент відновлення НСТ зменшується.

У пробу, що містила 0,15 М фосфатний буфер, додавали аліквоту сироватки, клітинного лізату чи гомогенату слизових оболонок (0,5 мг білка), загальний об'єм проби становив 0,5 мл. До проби додавали 1 мл реагенту I (57 мкМ НСТ, 16 мкМ ФМС на 0,15 М фосфатному буфері з ЕДТА, рН=7,8). Одразу вимірювали поглинання проб при $\lambda=540$ нм на спектрофотометрі (СФ-46, ЛОМО, Росія). Потім до кожної проби додавали 0,035 мл реагенту II (98,5 мкМ НАДН на Трис-ЕДТА буфері, рН=8,0), ставили у темряву та повторно визначали екстинкцію через 10 хв за тих же умов. Проби витримували при 30°C. За формулою розраховували відсоток пригнічення ступеню відновлення НСТ у пробі:

$$E = \frac{\Delta E_{\text{нул}} \times 50}{\Delta E_{\text{докл}} \times 100 \times t \times a}, \text{ де:}$$

E – активність супероксиддисмутази;

$\Delta E_{\text{нул}}$ - екстинція проби до додавання реагенту II;

$\Delta E_{\text{докл}}$ - екстинція проби після додавання реагенту II;

$50/100$ – 50% блокування реакції відновлення НСТ;

a – вміст білка в пробі, мг.;

t – час інкубації 10 хв.

Активність ферменту виражали в умовних одиницях на хвилину на 1 мг білка.

3.11. Визначення активності каталази

Активність каталази (КФ 1.11.1.6) в клітинах визначали за Королук і співавт. [125]. Принцип методу полягає в тому, що каталаза руйнує субстрат H_2O_2 , незруйнована частина пероксиду водню при взаємодії з солями молібдену утворює стійкий забарвлений комплекс.

У пробірки вносили 2 мл 0,03 % розчину пероксиду водню. Реакцію починали додаючи 0,1 мл сироватки, клітинного лізату чи гомогенату слизових оболонок (0,1 мг білка). У контрольну пробу замість білка додавали 0,1 мл дистильованої води. Проби витримували при кімнатній температурі протягом 10 хв, реакцію зупиняли додаванням 1 мл 4 % молібдату амонію. Інтенсивність забарвлення вимірювали на спектрофотометрі (СФ-46, ЛОМО, Росія) при $\lambda=410$ нм проти контрольної проби, у яку замість пероксиду водню додавали 2 мл H_2O .

Активність каталази розраховували за формулою:

$$E = \frac{(A_{хол} - A_{досл})}{K \times t \times a}, \text{ де:}$$

E – активність каталази;

$A_{хол}$ і $A_{досл}$ - екстинція контрольної та дослідної проб;

K – коефіцієнт мілімолярної екстинкції перекису водню, що дорівнює $22,2 \times 10^3 \text{ мМ}^{-1} \times \text{см}^{-1}$;

t – час інкубації 10 хв;

a – вміст білку в пробі, мг.

Активність визначали у нМоль H_2O_2 на хвилину на 1 мг білка.

3.12. Флуорометричний метод визначення вмісту відновленого глутатіону

Визначення кількості відновленого глутатіону засновано на модифікації методу Коха і Лайла [126, 127]. В основі методу лежить реакція взаємодії відновленого глутатіону з ортофталевим альдегідом (ОПТ) як з флуоресцентним реагентом. При цьому утворюються високофлуоресцентні продукти, які активуються при 350 нм і мають чітко виражений пік при 420 нм. Реактив ОПТ готували перед дослідом у концентрації 1 мг/мл в метанолі [126]. Показано, що реакція залежить від кислотно-лужних характеристик середовища, і проходить при рН 8,0, так як зміна рН нижче вказаного рівня супроводжується зменшенням інтенсивності флуоресценції, і навпаки зміна рН в бік лужного середовища викликає перетворення відновленої форми глутатіону (GSH) в окислену (GSSG). Інтенсивність флуоресценції для ОПТ-GSH – реакції прямо і лінійно залежить від концентрації GSH в межах від 10 нг до 4 мкг GSH.

Відібрані зразки розморожували та гомогенізували на льоду в малому тефлоновому гомогенізаторі Поттера-Ельвельгема з додаванням 1,5 мл 0,01 М HCl для осадження білків [127]. Далі центрифугували на холоді (+4°C) при 20000 g протягом 15 хв для отримання супернатанту, в якому визначали вміст відновленого глутатіону.

Приготування проб для вимірювання концентрації GSH проходило за наступною схемою. До 0,1 мл супернатанту додавали 100 мкл 0,1М фосфатного буферу з формаліном (1:4 (V/V) 37 % формалін [112]; 0,1 М $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$) (проби витримували 5 хв при кімнатній температурі); 2 мл 0,1 М фосфатного буферу, який містив 1мМ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$, 1мМ $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, рН 8; 100 мкл ортофталевого альдегіду. Після 45-хвилинної інкубації при кімнатній температурі вимірювали інтенсивність флуоресценції при 420 нм за активації 350 нм на спектрофлуорофотометрі (RF-1501, Shimadzu, Японія). Для визначення концентрації GSH побудовано калібрувальну криву. Вміст GSH виражали в нмоль на 1 мг білка.

3.13. Визначення глутатіонпероксидазної активності

Для визначення активності глутатіонзалежних ферментів сироватку, клітинну суспензію, гомогенат слизової оболонки центрифугували на холоді (+4° C) при 20000 g протягом 15 хвилин для отримання супернатанту, який і використовувався для визначення активностей ферментів.

Активність глутатіонпероксидази (КФ 1.11.1.9), як і інших глутатіонзалежних ферментів визначали за Власовою та ін [128]. Активність даного ферменту визначали за накопиченням GSSG. До складу реакційної суміші входили: 1 мл 0,3 М фосфатного буферу, що містив 12 мМ азид натрію; 6 мМ ЕДТА, рН 7,4; 0,5 мл 2,5 мМ GSSG; 0,2 мл супернатанту; 0,5 мл 1,8 мМ H₂O₂. Реакцію запускали додаванням 0,5 мл 1,8 мМ пероксиду водню, зупиняли через 2 хв додаванням 0,5 мл 10 % трихлороцтової кислоти. Після центрифугування при 3000 об/хв протягом 15 хв визначали екстинцію GSSG при довжині хвилі 260 нм. Активність ферменту виражали в мікромолях GSSG на 1 мг білка за хв за формулою:

$$A = a - b / c \times t, \text{ де:}$$

a - кількість окисненого глутатіону в контрольній пробі з урахуванням неферментативного окиснення, нмоль/мл;

b - кількість окисненого глутатіону в дослідній пробі з урахуванням неферментативного окиснення, нмоль/мл;

c - кількість білка в досліджуваній пробі, мг;

t - час інкубації, хв.

3.14. Визначення глутатіонтрансферазної активності

Активність глутатіонтрансферази (КФ 2.5.1.18) в цитозолі визначали за швидкістю утворення кон'югату з 1-хлор-2,4-динітробензолом (ХДНБ), який характеризується максимумом поглинання при 346 нм [128, 129].

Для визначення активності глутатіонтрансферази готували суміш: 1,5 мл 0,1 М фосфатного буферу (рН 6,5), 0,2 мл 10 мМ GSH, 0,1 мл супернатанту досліджуваного зразка. Реакцію починали додаванням 0,02 мл 0,1 М ХДНБ.

Приріст оптичної густини реєстрували протягом 3–5 хв при 340 нм на спектрофотометрі (СФ-6305, Ломо, Росія) і виражали в наномолях глутатіонового кон'югату (GSR) на 1 мг білка за хв.

Активність ферменту розраховували за формулою:

$$A = \Delta E \times V \times 1000 / 9,6 \times a \times t, \text{ де:}$$

ΔE – зміна оптичної густини за час t ;

V – кінцевий об'єм в кюветі після додавання останнього компонента, мл;

1000 – коефіцієнт перерахунку мікромолей в наномолі;

9,6 – коефіцієнт екстинкції мілімолярного поглинання кон'югату, $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$;

a – кількість білка в досліджуваній пробі, мг;

t – час інкубації, хв.

3.15. Визначення глутатіонредуктазної активності

Активність глутатіонредуктази (КФ 1.8.1.7) визначали за Власовою та ін. [128], з модифікацією для вимірювання в мікрокюветі, із загальним об'ємом реакційної суміші 535 мкл. Визначення активності ферменту проводили за зменшенням вмісту NADPH. До складу реакційної суміші входили 350 мкл фосфатного буферу (0,05 М рН 8,0), 35 мкл 1 мМ ЕДТА, 50 мкл 7,5 мМ GSSG; 50 мкл цитозольної фракції паріетальних клітин; 50 мкл 1,2 мМ NADPH. Активність ферменту визначали по зниженню кількості NADPH при 37° С протягом 8 хв, при довжині хвилі 340 нм на спектрофотометрі (СФ-6305, Ломо, Росія). Активність виражали в наномолях NADPH на 1 мг білка за хв по формулі:

$$A = \Delta E_6 \times V / 6,22 \times a \times t, \text{ де:}$$

$\Delta E = \Delta E_1 - \Delta E_2$ – різниця оптичної густини між першою та останньою хвилиною замірів;

V – загальний об'єм проби, мл;

6,22 – оптична густина 1 мкМ NADPH в 1 мл при $\lambda=340$ нм;

a – кількість білка, мг;

t – час інкубації, хв.

3.16. Цитоморфологічна оцінка реакції лімфоїдних органів

Реакцію лімфоїдних органів оцінювали за ваговими індексами та відносним вмістом лімфоїдних клітин [130], які розраховували шляхом визначення співвідношення ваги органу до загальної ваги тварини та кількості клітин до ваги органу відповідно. Для цього тварин зважували, умертвляли методом цервікальної дислокації, після чого виділяли тимус і селезінку зважували їх та поміщали у розчин Хенкса на льоду. Далі ці органи гомогенізували в гомогенізаторі Поттера зі слабко притертою приймочкою: тимус у 3 мл та селезінку у 5 мл охолодженого розчину Хенкса. Отриманий гомогенат тимусу розводили в 5 разів розчином Хенкса, селезінку – в 10 разів розчином Хенкса (лізис еритроцитів проводили 3 % оцтовою кислотою), після чого проводили підрахунок лімфоїдних клітин, визначаючи їх життєздатність за допомогою трипанового синього. Для цього в імунологічні планшети вносили по 0,1 мл клітинної суспензії і 0,1 мл 0,2 % розчину трипанового синього, інкубували при 37⁰ С протягом 10 хв., далі в камері Горяєва підраховували клітини [131]. Життєздатність клітин вважалась задовільною, коли кількість лімфоцитів з непошкодженими мембранами (непофарбовані клітини) становила 80 % і більше.

3.17. Визначення титру інтерферону в супернатантах клітинних культур тимоцитів і спленоцитів

Інтерферон визначали за антивірусною активністю мікрометодом, враховуючи цитопатогенну дію вірусу везикулярного стоматиту в перещеплюваній культурі щурячих фібробластів [132].

Вміст інтерферону визначали в супернатанті клітинних культур, який отримували наступним чином: 5×10^6 тимоцитів або спленоцитів в 5 мл повного поживного середовища (DMEM/F12, 10 % ембріональної телячої сироватки, 2 mM L-глутаміну, 100 од/мл пеніциліну, 100 мкг/мл стрептоміцину та канаміцину, 10 мкг/мл флуконазолу) інкубували 24 години при 37⁰ С. В якості індукторів інтерферону використовували фітогемаглютинін (ФГА) («Sigma-

Aldrich», США) в концентрації 20 мкг/мл та циклоферон (ЦФН) (ТОВ «НТФФ Полісан», Росія) в концентрації 50 мкг/мл. Потім суспензії клітин центрифугували протягом 5 хв при 200 g та збирали супернатанти, які зберігали при -20°C .

В лунки 96-лункового імунологічного планшета висівали клітини перещеплюваної культури щурячих фібробластів у об'ємі 100 мкл (2×10^5 /мл). Через 24 год на моношар клітин наносили по 100 мкл двократних розведень досліджуваних проб. В якості позитивного контролю використовували попередньо отриману стандартну пробу інтерферону. Ще через 24 години в кожен лунку вносили по 100 тканинних цитопатогенних доз вірусу везикулярного стоматиту. На наступний день враховували результати. Титром вважали найбільше розведення, яке захищало більш ніж 50 % клітин моношару від цитопатогенної дії вірусу. Результати виражали в \log_2 титру.

3.18. Визначення активності 2',5'-олігоаденілат-синтетази в тимоцитах і спленоцитах

Активність 2',5'-олігоаденілат-синтетази вимірювали в екстракті лімфоцитів селезінки і тимусу, отриманих шляхом центрифугування лізату клітин при 10000 об/хв протягом 15 хв (супернатант) [133]. Ферментативну активність оцінювали спектрофотометричним методом [134] за кількістю неорганічного пірофосфату як одного з продуктів синтезу олігоаденілату з АТФ під дією 2',5'-олігоаденілат-синтетази. Для цього визначали рівень NADP·H, який відновлюється в результаті каскадних ферментативних реакцій, що ініціюються пірофосфатом.

Для створення необхідного середовища інкубації готували три буферні системи (рН = 7,6): триетаноламінова суміш (ТМ), яка містила 7мл 1 М триетаноламіну, 245 мкл льодяної оцтової кислоти; 2 мл 1 М ацетату магнію, 2 мл 1 М ацетату калію, 400 мкл 500 мМ ЕДТА, 200 мкл 1 М ДТТ, 88 мл H_2O ; АТФ-суміш (АМ), яка містила 151 мг АТФ, 8,75 мл H_2O , 750 мкл 1 М триетаноламіну, 500 мкл 1 М ацетату магнію, 40 мкл 500 мМ ЕДТА;

ферментативна суміш (ЕМ), яка містила 3 мл ТМ, 6,5мл H₂O, 300 мкл 100 мМ NADP⁺, 200 мкл 100 мМ УДФ-глюкози, 30 мкл 10 мМ глюкозо-1,6-дифосфату, 7,5 од. УДФ-глюкозо-пірофосфорилази (печінка бика), 5 од. фосфоглюкомутази (м'язи кроля), 4 од. глюкозо-6-фосфат-дегідрогенази (дріжджі). Для визначення активності 2',5'-олігоаденілат-синтетази до 60 мкл клітинного екстракту додавали 120 мкл АМ, 400 мкл ЕМ, 600 мкл ТМ. Інкубацію, в тому числі з індукторами інтерферону: ФГА та ЦФН, проводили протягом 24 год. при 37°, після чого вимірювали оптичну густину при 340 нм на спектрофотометрі (СФ-6305, Ломо, Росія). Ферментативну активність виражали в наномолях неорганічного пірофосфату за 1 хв на 1 мг білка.

3.19. Визначення кількісного вмісту білка

Кількісний вміст білка у досліджуваних зразках визначали за методом Бредфорд [135]. Принцип методу полягає в тому, що барвник кумасі бриліантовий-синій G-250 змінює забарвлення при зв'язуванні з білком. При цьому максимум поглинання зміщується з 465 нм до 595 нм. У цьому випадку концентрація барвника, що зв'язався, прямо пропорційна кількості білка в пробі. При визначенні концентрації білка в сироватці крові, тимоцитах, спленоцитах, гомогенаті слизових оболонок шлунка, тонкого та товстого кишечника до 20 мкл проби додавали 10 мкл 10 % NaOH, 70 мкл дист. води та 2 мл робочого розчину Бредфорд, витримували 2-5 хв та визначали поглинання спектрофотометрично (СФ-6305, Ломо, Росія) при 595 нм проти контрольної проби.

3.20. Статистична обробка результатів

Статистичну обробку експериментальних даних проводили загальноприйнятими методами варіаційної статистики ($M \pm m$; $n=10$) [136]. Достовірність різниці показників оцінювали за допомогою t-критерію Стьюдента. Статистичні розрахунки та побудову графіків проводили з використанням програм «Microsoft Excel 2003» та «StatisticSoft 6.0».

РОЗДІЛ 4

ПОКАЗНИКИ МІКРОФЛОРИ ШЛУНКА І ТОВСТОГО КИШЕЧНИКА, КОНЦЕНТРАЦІЯ ГАСТРИНУ В СИРОВАТЦІ КРОВІ ЩУРІВ З ТРИВАЛОЮ ШЛУНКОВОЮ ГІПОАЦИДНІСТЮ ТА ЗА УМОВ ВВЕДЕННЯ МУЛЬТИПРОБІОТИКА «СИМБІТЕР®»

4.1. Видовий та кількісний склад мікрофлори слизових оболонок шлунка та товстого кишечника щурів за умов тривалого гіпоацидного стану в шлунку та введення мультипробіотика «Симбітер®»

Нормальна мікрофлора травного тракту здійснює цілий ряд важливих функцій в організмі, серед яких основними є метаболічна, захисна та трофічна [17, 137]. Соляна кислота шлунка є природнім фактором резистентності від заселення травного тракту небезпечними мікроорганізмами [138]. Гіпоацидний стан сприяє контамінації шлунка низхідним шляхом з верхніх відділів травного тракту і висхідним шляхом з кишечника патогенною мікрофлорою та її надмірному росту [139, 140]. Заселення травного тракту патогенними мікроорганізмами може призводити не лише до розвитку запалення та морфологічних порушень в слизовій оболонці, а й бути фактором ризику канцерогенезу [10, 141, 142, 143, 144].

Аналіз мікрофлори шлунка контрольних тварин свідчить про неширокий спектр бактерій, що входять до складу біоценозу цього органу (табл. 4.1.). З найбільшою частотою реєструвалась контамінація шлунка контрольних тварин грибами роду *Candida*, *Enterococcus*, *Escherichia coli*, молочнокислими бактеріями. Представники умовно-патогенної мікрофлори зі шлунка практично не висівались. Лише у 10 % тварин виявлено *Citrobacter*. Кількісні показники висіву зі шлунка *Enterococcus*, *E. coli* та грибів роду *Candida* не досягали високого рівня та складали 10^2 - 10^3 КУО/г. Концентрація лактобактерій, що виділені зі шлунка також була незначною (10^2 КУО/г).

Таблиця 4.1.

Кількісні показники мікробіоценозу шлунка щурів з тривалою шлунковою гіпоацидністю та за умов введення мультипробіотика «Симбітер®»

(lg КУО/г, $M \pm m$, n=10)

Мікроорганізми	Контроль	Омепразол	Омепразол + Симбітер
<i>Escherichia coli</i>	3,1±0,02	5,0±0,04*	3,0±0,03 [#]
<i>Escherichia coli</i> (зі зміненими ферментативними властивостями)	2,1±0,04	—	—
<i>Escherichia coli</i> (лактозонегативна)	—	4,4±0,02	—
<i>Klebsiella</i>	—	4,0±0,03	—
<i>Citrobacter</i>	4,0±0,06	4,3±0,05*	2,0±0,04 [#]
<i>Proteus</i>	—	5,1±0,03	—
<i>Enterobacter</i>	3,2±0,02	4,0±0,04	2,4 ±0,03 [#]
<i>Staphylococcus aureus</i>	—	4,2±0,02	—
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (з гемолізом)	—	2,8±0,03	—
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2,8±0,03	4,0±0,03*	2,1±0,01 [#]
<i>Enterococcus</i>	2,2±0,02	3,4±0,02*	2,6±0,04 [#]
Гриби роду <i>Candida</i>	2,0±0,04	4,1±0,02*	1,6±0,05 [#]
<i>Lactobacillus</i>	2,1±0,03	1,6±0,02*	3,8 ±0,01 [#]

* - $p < 0,05$ порівняно з контролем;

- $p < 0,05$ порівняно з групою тварин, яким вводили омепразол.

За умов 28-добового пригнічення секреції соляної кислоти, викликаного введенням ОМ, в шлунку щурів спостерігались значне зменшення частоти висіву лактобактерій та тенденція до зростання колонізації умовно-патогенною мікрофлорою та грибами роду *Candida*, порівняно з контрольними тваринами. Показано також зниження кількісних показників висіву зі шлунка нормальної мікрофлори в щурів цієї групи, а у 40 % тварин вони взагалі не виявлялись. Бактеріальний спектр шлунка тварин з гіпоацидним станом розширився за

рахунок висіву клебсієли, ентеробактера, протей. Концентрація цих умовно-патогенних бактерій досягала високого рівня (10^4 - 10^5 КУО/г).

Одержані дані свідчать про зниження колонізаційної резистентності слизової оболонки шлунка у тварин з 28-добовою гіпоацидністю шлункового соку та про можливість транзиту мікрофлори з кишечника у шлунок висхідним шляхом, що корелює з результатами інших досліджень наслідків тривалого застосування інгібіторів протонної помпи [144, 145, 146].

У групи щурів, які отримували одночасно з введенням омепразолу мультипробіотик СИМ, показники контамінації шлунка умовно-патогенною мікрофлорою практично не відрізнялись від контролю. Зменшився видовий спектр виділених зі шлунка ентеробактерій за рахунок відсутності *Klebsiella* та *Proteus*. У всіх обстежених тварин не виявлено колонізації шлунка *S. aureus*. Як і у контрольних щурів, до складу мікробіоценозу шлунка тварин цієї групи переважно входили *Enterococcus*, *E. coli*, гриби роду *Candida* в незначних концентраціях (10^2 - 10^3 КУО/г). Збільшився висів із шлунка лактобактерій до показників 10^4 КУО/г.

Таким чином, тривале пригнічення шлункової секреції соляної кислоти може призводити до мікроекологічних порушень і надмірного росту умовно-патогенної флори, яка за певних умов може стати причиною розвитку запалення. Мультипробіотик СИМ попереджає розвиток дисбіотичних процесів в шлунку щурів з 28-добовим гіпоацидним станом.

Бактеріологічні дослідження вмісту кишечника щурів з гіпоацидністю шлункового соку, викликаною введенням ОМ, порівняно з контролем, дозволили виявити негативні мікроекологічні зміни, які полягали у дисбалансі між показниками умовно-патогенної та нормальної мікрофлори (таб. 4.2.).

В групі щурів з 28-добовим пригніченням шлункового кислотоутворення зареєстровано збільшення частоти висіву та загальної кількості стафілококів і ентеробактерій родів *Proteus*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, а також грибів роду *Candida* порівняно з контролем.

Таблиця 4.2.

Кількісні показники мікрофлори товстого кишечника щурів з тривалою шлунковою гіпоацидністю та за умов введення мультипробіотика «Симбітер®»
(lg КУО/г, $M \pm m$, n=10)

Мікроорганізми	Контроль	Омепразол	Омепразол +Симбітер
<i>Escherichia coli</i>	7,3±0,03	3,6±0,04*	7,8±0,03 [#]
<i>Escherichia coli</i> (зі зміненими ферментативними властивостями)	3,0±0,02	6,8±0,05*	2,1±0,03 [#]
<i>Escherichia coli</i> (лактозонегативна)	2,0±0,01	8,1±0,02*	1,9±0,02 [#]
<i>Escherichia coli</i> (гемолітична)	-	6,0±0,03	-
<i>Klebsiella</i>	4,8±0,03	7,3±0,04*	4,8±0,04 [#]
<i>Citrobacter</i>	3,5±0,05	7,1±0,05*	2,9±0,05 [#]
<i>Proteus</i>	4,3±0,03	6,3±0,02*	3,8±0,02 [#]
<i>Enterobacter</i>	4,1±0,04	6,5±0,03*	3,9±0,03 [#]
<i>Gaphnia</i>	3,4±0,03	7,0±0,04*	4,2±0,02 [#]
<i>Edwardsiella</i>	3,0±0,02	7,1±0,01*	2,9±0,03 [#]
<i>Morganella</i>	3,7±0,02	7,1±0,02*	3,8±0,02 [#]
<i>Staphylococcus aureus</i>	2,3±0,04	5,3±0,03*	2,2±0,04 [#]
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (з гемолізом)	-	5,2±0,04	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	4,9±0,01	5,1±0,05	4,1±0,05
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	4,4±0,02	4,0±0,02	4,2±0,01
<i>Enterococcus</i>	6,3±0,04	3,4±0,03*	6,1±0,02 [#]
Гриби роду <i>Candida</i>	3,8±0,05	5,2±0,02*	3,4±0,03 [#]
<i>Bifidobacterium</i>	9,0±0,02	4,6±0,03*	9,6±0,04 [#]
<i>Lactobacillus</i>	7,5±0,03	5,1±0,04*	8,0±0,02 [#]

* - $p < 0,05$ порівняно з контролем.

- $p < 0,05$ порівняно з групою тварин, яким вводили омепразол.

Крім того, в групі тварин з тривалим гіпоацидним станом відмічено було також зростання вмісту лактозонегативних кишкових паличок та кишкової палички з гемолітичними властивостями. Майже у всіх тварин умовно-

патогенна мікрофлора знаходилась у трьох-п'ятикомпонентних асоціаціях. Концентрація різних видів ентеробактерій дорівнювала 10^6 - 10^8 КУО/г, стафілококів - 10^5 КУО/г, грибів роду *Candida* - 10^5 КУО/г. Встановлено тенденцію до зниження кількісних показників висіву нормальної кишкової палички та ентерококу. У 70 % щурів зареєстровано дефіцит індигенної мікрофлори, її концентрація складала лише 10^4 - 10^5 КУО/г (табл. 4.2.).

Отримані нами результати підтверджуються даними літератури про ризик розвитку дисбактеріозу в товстому кишечнику в наслідок зменшення кислотності в шлунку [145, 147, 148].

Показано, що введення щурам мультипробіотика СИМ за умов 28-добового пригнічення шлункового кислотоутворення зумовило нормалізацію показників контамінації товстого кишечника представниками умовно-патогенної та нормальної мікрофлори. Не зареєстровано виділення з товстого кишечника умовно-патогенних бактерій зі зміненими біологічними властивостями: гемолітичних *E. coli* та *S. epidermidis*. Найбільш суттєво зменшились кількісні показники висіву *S. aureus* (до 10^2 КУО/г) та грибів роду *Candida* (до 10^3 - 10^4 КУО/г). Статистично достовірно порівняно з контролем, зменшились показники висіву ентеробактерій (родів *Proteus*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter* та інших). Концентрація цих мікроорганізмів в кишечнику становила 10^3 - 10^5 КУО/г. При цьому значно зросла контамінація лактобактеріями (до 10^8 КУО/г) та біфідобактеріями (до 10^9 КУО/г).

Таким чином, введення мультипробіотика СИМ при гіпоацидності шлункового соку забезпечує відновлення мікробіоценозу товстої кишки. Отримані нами результати корелюють з численними даними літератури про нормалізуючий вплив пробіотиків за умов дисбіотичних порушень в травному тракті при різних захворюваннях [149, 150].

4.2. Концентрація гастрину в сироватці крові щурів з тривалою шлунковою гіпоацидністю та при дії мультипробіотика «Симбітер®»

Тривала гіпохлоргідрія в шлунку супроводжується гіпергастринемією, яка виникає за принципом негативного зворотнього зв'язку. Зростання рН в антральному відділі шлунка призводить до збудження рецепторів на поверхні гастрин-продукуючих клітин, що змушує їх синтезувати гастрин [151]. Секреція гастрину може також посилюватись внаслідок колонізації шлунка *Helicobacter pylori* [152] та секретуючих OmpA-подібний білок грамнегативних патогенних мікроорганізмів [153]. Крім того, патогенні мікроорганізми можуть спричиняти розвиток запальних процесів з вивільненням прозапальних цитокінів та оксиду азоту, які також здатні стимулювати синтез гастрину G-клітинами шлунка [77, 154]. Окрім регуляції кислотоутворення, гастрин здійснює трофічний вплив на слизову оболонку травного тракту [155, 156]. На сьогодні гіпергастринемія розглядається як важливий фактор ризику розвитку пухлин шлунка та товстого кишечника [9, 157, 158].

Незважаючи на існуючу достатньо велику кількість інформації про секрецію гастрину за умов різних кислотоасоційованих захворювань, залишається зовсім невизначеним можливий вплив пробіотиків на синтез гастрину в шлунку, в тому числі, під час тривалого пригнічення шлункової секреції соляної кислоти.

У щурів контрольної групи рівень гастрину в сироватці крові складав $59 \pm 35,5$ пг/мл (рис. 4.1.). Введення інтактним щурам мультипробіотика СИМ не викликало достовірної зміни концентрації гастрину в сироватці крові.

28-добове пригнічення шлункової секреції соляної кислоти ОМ спричиняло підвищення концентрації гастрину в сироватці крові щурів до $181,18 \pm 59,68$ пг/мл, що на 207 % ($p < 0,05$) перевищувало контрольні показники. Таке зростання сироваткової концентрації гастрину за умов гіпоацидного стану корелює з іншими дослідженнями концентрації цього гормону під час застосування інгібіторів протонної помпи [159, 160].

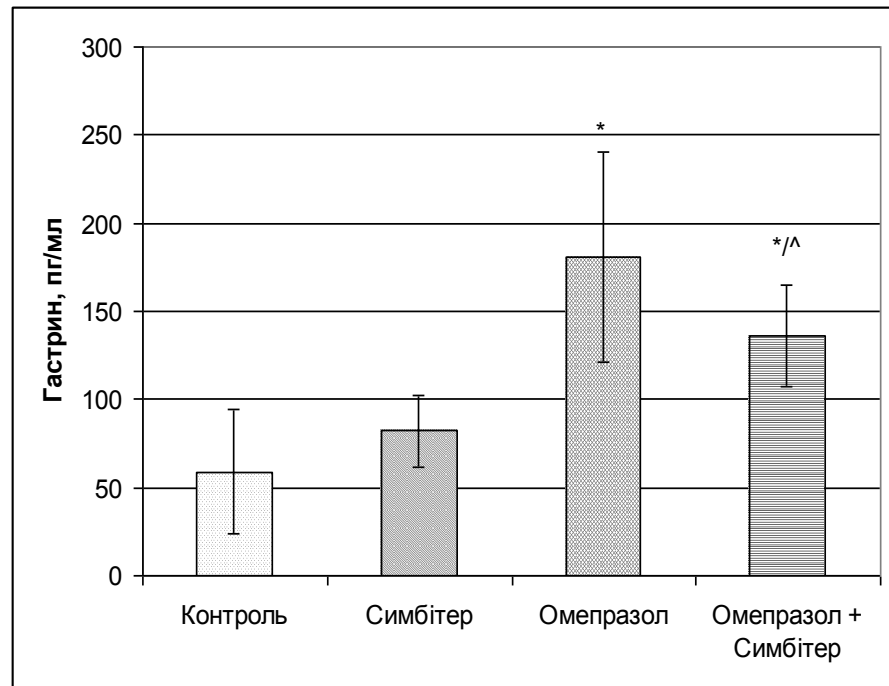


Рис. 4.1. Концентрація гастрину в сироватці крові щурів з тривалою шлунковою гіпоацидністю та за умов введення мультипробіотика «Симбітер®» ($M \pm m$, $n=10$).

* - $p < 0,05$ порівняно з контролем;

^ - $p < 0,05$ порівняно з групою тварин, яким вводили «Симбітер®».

Одночасне введення щурам з ОМ мультипробіотика СИМ зменшувало концентрацію гастрину в сироватці крові до $136,12 \pm 28,54$ пг/мл порівняно з групою тварин, яким вводили лише ОМ, та залишало збільшеним даний показник відповідно на 130,5 % ($p < 0,05$) і на 66 % ($p < 0,05$) порівняно з контролем та щурами, котрі отримували лише СИМ. Отже, введення мультипробіотика СИМ не впливало на концентрацію гастрину в сироватці крові щурів, в тому числі й за умов тривалої шлункової гіпоацидності.

В попередніх дослідженнях ми показали, що гіпергастринемія та дисбактеріоз, викликані 28-добовим введенням щурам ОМ, спричиняли розвиток дисплазії в слизовій оболонці шлунка та гіперплазії – в товстому кишечнику, яким запобігало введення мультипробіотика СИМ [161, 162, 163]. Оскільки гіпергастринемія та дисбактеріоз здатні викликати запалення, що в свою чергу також може сприяти розвитку морфологічних змін у шлунку та

товстому кишечнику, тому метою наших досліджень було визначення впливу СИМ на кількість медіаторів запалення, продукцію оксиду азоту, процеси перекисного окислення ліпідів та функціонування системи антиоксидантного захисту в сироватці крові, лімфоїдних клітинах, слизових оболонках шлунка та товстого кишечника щурів за умов тривалої шлункової гіпоацидності.

РОЗДІЛ 5

КОНЦЕНТРАЦІЯ ПРОЗАПАЛЬНИХ ЦИТОКІНІВ, ВМІСТ НІТРИТ-ІОНІВ І ТБК-АКТИВНИХ ПРОДУКТІВ, СТАН АНТИОКСИДАНТНОГО ЗАХИСТУ В СИРОВАТЦІ КРОВІ ЩУРІВ З ТРИВАЛОЮ ШЛУНКОВОЮ ГІПОАЦИДНІСТЮ ТА ЗА УМОВ ВВЕДЕННЯ МУЛЬТИПРОБІОТИКА «СИМБІТЕР®»

5.1. Концентрація прозапальних цитокінів у сироватці крові щурів з тривалою шлунковою гіпоацидністю та за умов введення мультипробіотика «Симбітер®»

Дисбактеріоз спричиняє запальний процес в організмі [164]. Хоч запалення є фізіологічною реакцією, в деяких випадках, коли фактор, який ініціює запальну реакцію не елімінується, запалення може призводити до пошкодження тканин [165]. Зв'язок запалення і раку доведений, але залишається актуальним питання про механізми розвитку пухлин ініційованих інфекціями, адже патогенні мікроорганізми можуть викликати також хронічне запалення, в тому числі в травному тракті. Хоча бактеріальні фактори агресії і відіграють важливу роль в патогенезі пухлинного процесу, але останні дослідження доводять визначальну роль захисних механізмів організму під час канцерогенезу в травному тракті [4].

Крім ключової ролі в регуляції імунної відповіді цитокіни приймають участь у захисті слизових оболонок травного тракту. Тому одним з ключових факторів патогенезу багатьох захворювань травного тракту є порушення балансу між про- і протизапальними цитокінами [166].

Прозапальні цитокіни інтерферон-гамма (ІФН- γ), фактор некрозу пухлин-альфа (ФНП- α), інтерлейкін-1бетта (ІЛ-1 β) та інтерлейкін-6 (ІЛ-6) є ключовою ланкою у механізмі захисту внутрішнього середовища від чужорідних субстанцій, патогенних мікроорганізмів і пухлинних клітин [167]. Під час розвитку запалення послідовно синтезуються ФНП- α , ІЛ-1 β , ІФН- γ та ІЛ-6. Потім ІЛ-6 починає пригнічувати секрецію ФНП- α та ІЛ-1 β , активуючи при

цьому гуморальну ланку імунітету [167, 168], тому його можна вважати як прозапальним, так і протизапальним цитокіном. На відміну від ІЛ-6 прозапальний цитокін ІФН- γ розглядається як основний активатор клітинно-опосередкованої імунної відповіді [169]. Крім того, прозапальні цитокіни також відіграють важливу роль у регуляції протипухлинної імунної відповіді [170].

Окрім впливу на розвиток запалення та участі в протипухлинному захисті, вищезгадані цитокіни можуть здійснювати цілий ряд важливих регулюючих функцій в травному тракті, серед яких здатність:

- пригнічувати шлункову секрецію соляної кислоти, причому ІЛ-1 β наприклад, у 100 разів потужніший супресор кислотоутворення, ніж існуючі інгібітори протонної помпи, та в 6000 разів сильніший за антагоністи H_2 -гістамінових рецепторів [171, 171];

- стимулювати секрецію гастрину G-клітинами шлунка [78, 173];

- викликати морфологічні зміни в слизовій оболонці [174].

До того ж, поліморфізм генів прозапальних цитокінів розглядається багатьма вченими як фактор ризику розвитку пухлин в шлунково-кишковому тракті [175, 176]. Отже, вищезазначені ефекти надмірного синтезу прозапальних цитокінів за умов дисбактеріозу під час гіпоацидності шлункового соку можуть сприяти канцерогенезу в травному тракті [177] та неконтрольованій активації імунної відповіді [178].

На сьогодні для корекції дисбіозів за умов різних патологічних станів у травному тракті широко використовуються пробіотики, які можуть впливати на розвиток імунної відповіді, в тому числі за рахунок індукції синтезу різних цитокінів [91, 179].

Нами було визначено концентрацію основних прозапальних цитокінів у сироватці крові щурів з тривалою шлунковою гіпоацидністю та за умов введення мультипробіотика СИМ (рис. 5.1.).

В контрольній групі щурів концентрація ІФН- γ , ФНП- α , ІЛ-1 β та ІЛ-6 в сироватці крові становила $41 \pm 2,2$, $90 \pm 4,5$, $96 \pm 6,7$, та $55 \pm 3,8$ пг/мл відповідно.

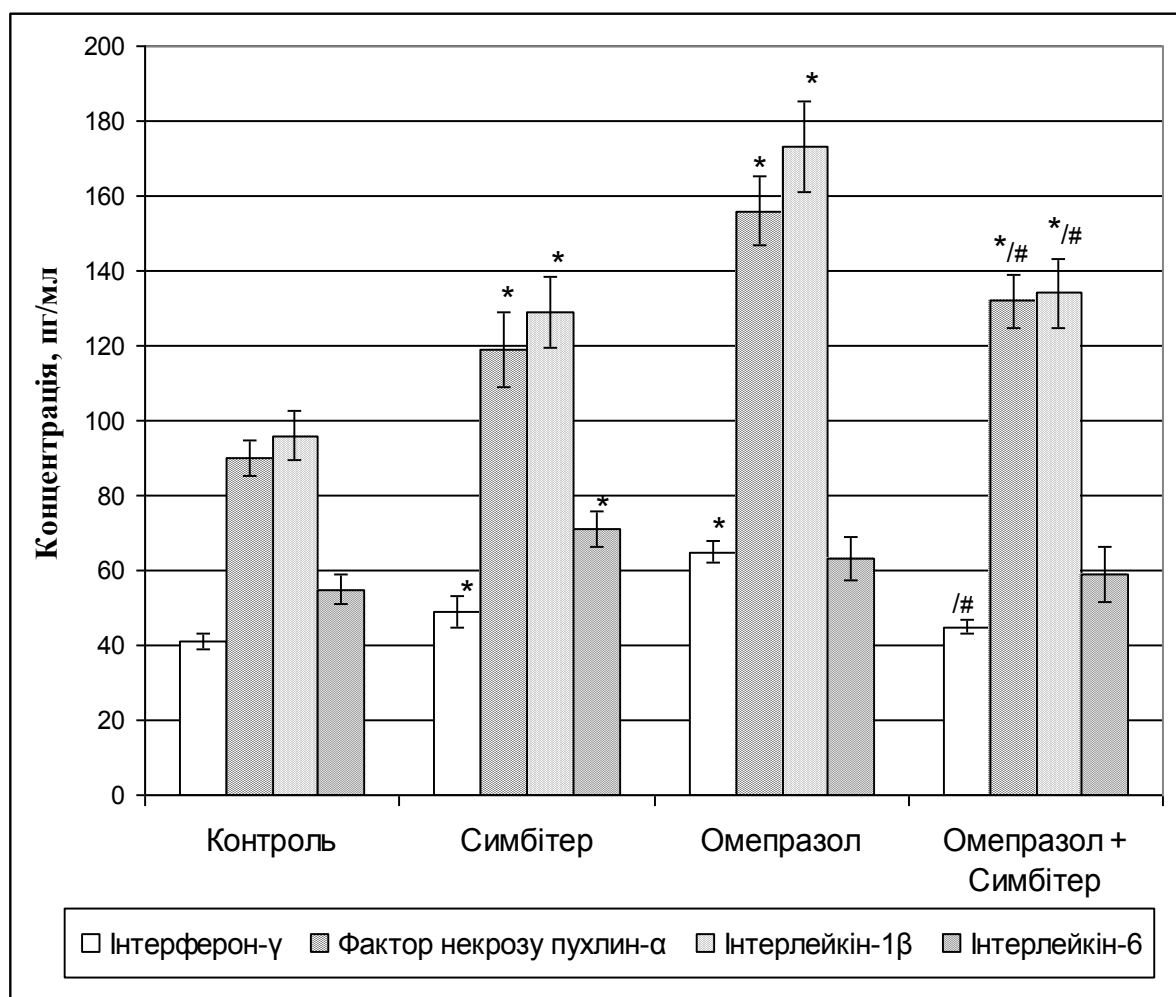


Рис. 5.1. Концентрація інтерферону- γ , фактору некрозу пухлин- α , інтерлейкінів-1 β та -6 у сироватці крові щурів з тривалою шлунковою гіпоацидністю та за умов введення мультипробіотика «Симбітер®» ($M \pm m$, $n=10$)

* - $p < 0,05$ порівняно з контролем;

- $p < 0,05$ порівняно з групою тварин, яким вводили омепразол

У щурів, яким вводили лише мультипробіотик СИМ, концентрація сироваткових ІФН- γ , ФНП- α , ІЛ-1 β , ІЛ-6 зростала відповідно до $49 \pm 4,3$ пг/мл (на 20 %, $p < 0,05$), $119 \pm 10,2$ пг/мл (на 32 %, $p < 0,05$), $129 \pm 9,6$ пг/мл (на 34 %, $p < 0,05$) і $71 \pm 4,9$ пг/мл (на 29 %, $p < 0,05$) порівняно з контролем. Підвищення концентрації досліджуваних прозапальних цитокінів за умов введення СИМ свідчить про здатність мікроорганізмів, що входять до складу цього мультипробіотику, викликати специфічну імунну відповідь, причому, ймовірно,

обох її ланок. Такий ефект може бути пов'язаний з багатокомпонентним складом цього препарату, адже відомо, що пробіотичні мікроорганізми володіють штамоспецифічною здатністю стимулювати синтез різних цитокінів [180, 181].

Гіпоацидний стан шлункового соку, викликаний 28-добовим введенням щурам ОМ, в сироватці крові щурів призводив до збільшення концентрації ІФН- γ на 59 % до $65 \pm 3,1$ пг/мл ($p < 0,05$), ФНП- α на 73 % до $156 \pm 9,1$ пг/мл ($p < 0,05$), ІЛ-1 β на 80 % до $173 \pm 12,1$ пг/мл ($p < 0,05$) та не змінював концентрацію ІЛ-6, яка становила $63 \pm 5,7$ пг/мл, порівняно з контрольною групою тварин. Зафіксоване зростання концентрації основних прозапальних цитокінів за умов тривалого пригнічення шлункової секреції соляної кислоти може свідчити про їх залучення до активного розвитку запалення та клітинно-опосередкованої імунної відповіді, які, ймовірно, пов'язані з дисбактеріозом та гіпергастринемією, що виникають внаслідок інгібування кислотоутворення в шлунка.

Введення мультипробіотика СИМ за умов 28-добової гіпоацидності шлункового соку в сироватці крові щурів нормалізувало концентрацію ІФН- γ до $45 \pm 2,1$ пг/мл та ІЛ-6 до $59 \pm 7,4$ пг/мл і спричиняло зменшення концентрації ФНП- α на 15 % ($p < 0,05$) та ІЛ-1 β на 20 % ($p < 0,05$) відповідно, порівняно з групою щурів, яким вводили ОМ. Концентрації сироваткових ФНП- α та ІЛ-1 β в даній групі становили відповідно $132 \pm 7,2$ пг/мл та $134 \pm 9,4$ пг/мл та достовірно не відрізнялись від щурів, яким вводили лише СИМ, але значень контрольної групи тварин не досягали, залишаючись збільшеними на 46 і 39 % ($p < 0,05$) порівняно з контролем. Протизапальний вплив мультипробіотика СИМ за умов гіпоацидного стану, що реалізується через зміну сироваткової концентрації прозапальних цитокінів, може свідчити про імуномодулюючі властивості пробіотичних мікроорганізмів цього препарату, які, ймовірно, як і інші пробіотичні бактерії володіють здатністю регулювати синтез цитокінів під час різних захворювань [182, 183, 184].

Отже, за умов тривалої гіпоацидності поєднаної з дисбактеріозом надмірні кількості прозапальних цитокінів можуть сприяти розвитку канцерогенезу шляхом додаткового пригнічення шлункової секреції соляної кислоти, стимуляції синтезу гастрину, активації запальних процесів та окисного стресу, пошкоджуючого впливу та індукції апоптозу в слизових оболонках травного тракту. Крім того, прозапальні цитокіни можуть також перешкоджати утворенню пухлин за рахунок активації клітинної ланки імунітету із залученням ефекторних клітин, пригніченням проліферації та запуском апоптозу в новоутворених пухлинних клітинах. Мультипробіотик СИМ за умов тривалого пригнічення кислотоутворення в шлунку може здійснювати свій імуномодулюючий вплив шляхом зміни концентрації досліджуваних прозапальних цитокінів у сироватці крові щурів.

Таким чином, прозапальні цитокіни за рахунок взаємозалежних і взаємодублюючих функцій та можливості викликати різний біологічний ефект через взаємодію з одним і тим же рецептором на клітині не дозволяють точно передбачити розвиток реакції організму на їх дію під час імунної відповіді та запальних реакцій, в тому числі за умов введення мультипробіотика на фоні тривалої гіпоацидності шлункового соку. Тому наступним етапом наших досліджень було з'ясування інших цитокін-опосередкованих механізмів розвитку запалення, причин морфо-функціональних порушень у травному тракті за умов тривалого пригнічення шлункової секреції соляної кислоти та можливих механізмів корекції цих наслідків мультипробіотиком СИМ.

5.2. Вміст нітрит-іонів у сироватці крові щурів з тривалим пригніченням шлункової секреції соляної кислоти та за умов введення мультипробіотика «Симбітер®»

Запалення є однією з найважливіших складових протиінфекційного захисту організму. На сьогодні доведена ключова роль оксиду азоту (NO) в регуляції імунних реакцій та його участь практично на кожному етапі розвитку запалення [185]. При інфекційних захворюваннях NO може виконувати

регуляторні та ефекторні функції за рахунок протекторного або тканинопошкоджуючого ефекту на різних стадіях імунної відповіді [186, 187, 188].

Відомо, що NO залучений до механізмів протибактеріального неспецифічного імунітету, а також частково до комплексного механізму тканинного пошкодження через модуляцію запального процесу та апоптозу. За умов формування запальних субстратів стимуляція фагоцитів бактеріальними ліпополісахаридами, вірусами і прозапальними цитокінами (ІФН- γ , ФНП- α , ІЛ-1) та особливо їх комбінацією призводить до утворення в імунокомпетентних клітинах NO, який викликає загибель багатьох патогенних мікроорганізмів або зупиняє їх ріст [187, 188, 189]. В реалізації цього ефекту виділяють два феномена [190]: 1) апоптичну загибель клітин-носіїв, яка обмежує сприятливе середовище для розмноження мікроорганізмів та дисемінацію інфекційного процесу; 2) виділення токсичних субстанцій. В основі антимікробної дії лежить здатність реактивних проміжних продуктів NO викликати нітрозилування та дезамінування білків, окисне пошкодження та порушення системи репарації ДНК [191]. Цитотоксична дія NO посилюється завдяки його здатності вступати в реакцію з супероксидним радикалом, внаслідок чого утворюється пероксинітрит, який володіє набагато більшою реакційною здатністю, чим окремо NO і супероксидний радикал, та може безпосередньо пошкоджувати ДНК, що є однією з причин апоптозу та некрозу клітин [192]. Подальший розвиток імунної реакції на інфекційний процес супроводжується антигенспецифічною проліферацією Т- і В-лімфоцитів з наступним їх диференціюванням на ефекторні клітини [188]. Виявилось, що NO може не тільки опосередковувати Т-лімфоцитозалежні ефекти, а й впливати на Т-клітинні механізми регуляції активності макрофагів, змінюючи баланс Th1/Th2 [187, 193]. На сьогодні було показано, що NO може як активувати [194], в тому числі за рахунок сприяння синтезу ІФН- γ [195], так і гальмувати [196] Th1-ланку імунітету, а також інгібувати експресію багатьох прозапальних цитокінів, зокрема ІЛ-1 β , ФНП- α , ІЛ-6 та ІФН- γ [188]. Такий регулюючий

вплив NO на баланс Th1/Th2 може залежати від його концентрації: низькі концентрації вибірково поляризують імунну відповідь в напрямку Th1-ланки, а високі – Th2-ланки [197].

Окрім протимікробної дії та здатності впливати на розвиток імунної відповіді NO виконує цілий ряд регулюючих функцій при фізіологічних та патологічних станах [198], в тому числі в травному тракті [199]. На сьогодні, відомо, що NO не тільки відіграє одну з визначальних ролей у захисті та пошкодженні слизових оболонок травного тракту [200], а й може пригнічувати секрецію соляної кислоти в шлунку [201] та стимулювати синтез гастрину [79]. Тому нами було досліджено вміст нітрит-іонів (NO_2^-) в сироватці крові щурів з тривалою гіпоацидністю шлункового соку за умов введення мультипробіотика СИМ (рис. 5.2.).

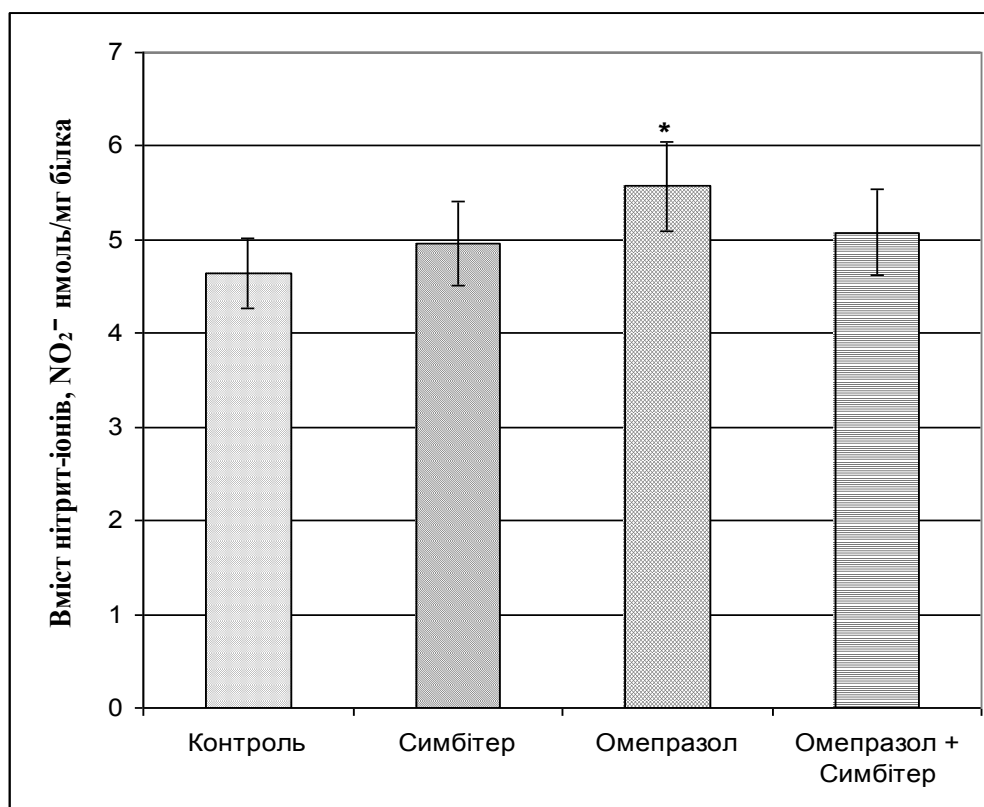


Рис. 5.2. Вміст нітрит-іонів в сироватці крові щурів з тривалою шлунковою гіпоацидністю та за умов введення мультипробіотика «Симбітер®» ($M \pm m$, $n=10$)

* - $p < 0,05$ порівняно з контролем.

Вміст NO_2^- в сироватці крові контрольної групи тварин складав $4,64 \pm 0,42$ нмоль/мг білка. За умов введення мультипробіотика СИМ інтактним щурам нами не було виявлено змін вмісту NO_2^- в сироватці крові порівняно з контролем. У сироватці крові щурів з тривалою шлунковою гіпоацидністю спостерігалось збільшення вмісту NO_2^- на 20 % ($p < 0,05$). Це може свідчити про залучення NO до активації клітинно-опосередкованої імунної відповіді через його здатність в низьких концентраціях стимулювати клітинну ланку імунітету та до розвитку запального процесу [194, 197, 202], які виникають внаслідок порушення мікробіоценозу в травному тракті. Крім того, невелике збільшення вмісту NO_2^- в сироватці крові може бути пов'язане з тим, що синтезований NO під час запалення здійснює свої біологічні функції безпосередньо в тканинах слизових оболонок травного тракту, де зокрема може викликати ушкодження клітинних структур [203].

На сьогодні вважається незаперечним, що система оксиду азоту бере участь у регуляції залежних від кисню процесів, зокрема активності ферментів системи антиоксидантного захисту та перикисного окислення ліпідів [204]. Тому наступним етапом наших досліджень було визначення продуктів перикисного окислення ліпідів та стану антиоксидантної системи в сироватці крові щурів з тривалим гіпоацидним станом та за умов введення мультипробіотика СИМ.

5.3. Вміст ТБК-активних продуктів у сироватці крові щурів з тривалою шлунковою гіпоацидністю та за умов введення мультипробіотика «Симбітер®»

Процеси перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) належать до основних метаболічних реакцій, що відбуваються в клітині. Не викликає сумніву, що присутність вільних радикалів в організмі має певне фізіологічне значення [205]. Перебіг багатьох біологічних процесів неможливий без наявності вільних радикалів. Утворення O_2^- та інших активних кисневих форм забезпечує цитотоксичну дію фагоцитів, є механізмом регуляції процесу поділу клітин,

забезпечує попередження злоякісної трансформації клітин, модуляцію «запрограмованої» загибелі клітин (апоптоз), ротацію білкового й ліпідного компоненту біомембран, синтезу ряду біологічно активних речовин (простагландинів, простациклінів, катехоламінів, стероїдів, тромбоксанів, лейкотриєнів тощо) [206, 207]. Відомо, що вільні радикали відіграють важливу роль у підтримці транспорту електронів у дихальному ланцюзі, індукції утворення пор у мітохондріальній мембрані. Окисні процеси за участю активованих кисневих метаболітів – невід'ємна частина існування вищих форм живих організмів. Вони виконують функцію між- і внутрішньоклітинних месенджерів, модуляторів та індукторів у біохімічній регуляції й реалізації метаболічних процесів, є найпершою і найбільш мобільною ланкою в адаптаційній перебудові організму при екстремальних впливах [208].

У процесі розвитку деяких патологічних процесів різко підвищується інтенсивність ліпопероксидації, що робить її універсальним механізмом пошкодження клітинних мембран. Продукти ПОЛ мембранотоксичні, вони деформують мембрани клітин, порушують їх осмотичну резистентність і електричний потенціал, окислюють тіолові сполуки і SH-групи білків мембран, розривають нуклеїнові кислоти, денатурують білки, пошкоджують амінокислоти, вітаміни, сприяють деградації макромолекул сполучної тканини. Нагромадження продуктів ПОЛ (пероксиду водню, гідроксильного радикалу, супероксидного аніон-радикалу, синглетного кисню) призводить до пошкодження генетичного апарата клітин і гальмує клітинний поділ, пригнічує окислювальне фосфорилування і гліколіз, стимулюючи розпад лізосом, погіршує перебіг гострого запального процесу, збільшує проникність капілярів, спричинюючи набряк тканин, активний транспорт іонів і внутрішньоклітинну компартменталізацію, справляючи вазоконстрикторний вплив, а також знижує активність Ca^{2+} -залежної АТФази, цитохрому С та інших ферментів, змінюючи їх субстратну специфічність [209, 210].

В літературі є дані про те, що при екстремальних впливах в організмі активуються окисно-відновні реакції, котрі призводять до утворення ліпо- і

гідроперекисів, подальше розкладання яких сприяє утворенню ендogenous кисню, необхідного для життєдіяльності клітин. У фізіологічних умовах існує певна рівновага між продукуванням вільних радикалів і їхньою нейтралізацією, а також різні механізми її підтримки [205, 206].

Швидкість вільнорадикального окислення в органах і тканинах підтримується на певному рівні. При пошкоджуючих впливах порушення ПОЛ є ранньою, універсальною неспецифічною ланкою патогенезу багатьох захворювань. Особливо варто підкреслити, що зміна вільнорадикального окиснення звичайно передуює появі клінічних симптомів ушкодження [208]. Тому нами було досліджено рівень ПОЛ за вмістом ТБК-активних продуктів у сироватці крові щурів з тривалою гіпоацидністю шлункового соку та за умов введення мультипробіотика СИМ.

У результаті дослідження вмісту ТБК-активних продуктів у сироватці крові щурів нами було встановлено зниження їх рівня на 50 % ($p < 0,05$) за умов введення мультипробіотика СИМ (рис. 5.3.), що може свідчити про зниження процесів ПОЛ. Встановлений нами ефект корелює з дослідженнями [211, 212, 213], в яких була показана властивість різних штамів молочно-кислих бактерій пригнічувати процеси ПОЛ, захоплювати вільні радикали, посилювати експресію генів антиоксидантної системи в різних тканинах.

28-добове пригнічення шлункової секреції соляної кислоти, викликане введенням ОМ, у щурів призводило до збільшення вмісту ТБК-активних продуктів на 88 % ($p < 0,05$) в сироватці крові порівняно з контролем, що свідчило про активацію процесів ПОЛ, які могли бути пов'язані з порушеннями прооксидантно-антиоксидантної рівноваги за умов розвитку дизбіотичних процесів у травному тракті. Отриманий ефект корелює з даними про активацію інтенсивності процесів ПОЛ з підвищенням рівня ТБК-активних продуктів у хворих на хронічний гастрит із секреторною недостатністю [214], але не узгоджується з даними інших досліджень, які свідчать про антиоксидантні властивості ОМ [215, 216]. Це може бути пов'язано з тим, що в даних

дослідженнях вивчалась короткотривала дія ОМ, під час якої не відбувався розвиток негативних наслідків тривалої гіпоацидності в шлунку.

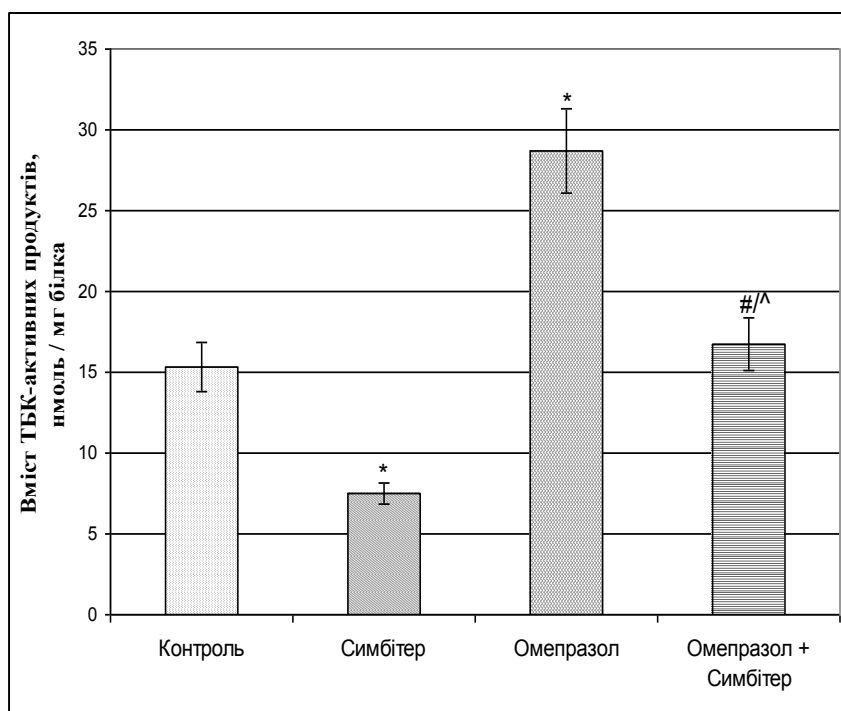


Рис. 5.3. Вміст ТБК-активних продуктів у сироватці крові щурів з тривалою шлунковою гіпоацидністю та за умов введення мультипробіотика «Симбітер®» ($M \pm m$, $n=10$)

* – $p < 0,05$ порівняно з контролем;

– $p < 0,05$ порівняно з групою тварин, яким вводили омепразол;

^ – $p < 0,05$ порівняно з групою тварин, яким вводили «Симбітер®».

Введення мультипробіотика СИМ за умов 28-добової шлункової гіпоацидності попереджало чи усувало збільшення вмісту ТБК-активних продуктів, що свідчило про нормалізацію процесів ПОЛ та могло бути пов'язано з активацією пробіотиком системи антиоксидантного захисту (АОЗ). Тому наступним етапом наших досліджень було визначення вмісту відновленого глутатіону та активності антиоксидантних ферментів у сироватці крові щурів з тривалою шлунковою гіпоацидністю та за умов введення мультипробіотика «Симбітер®».

5.4. Вміст відновленого глутатіону й активність антиоксидантних ферментів у сироватці крові щурів з тривалою гіпоацидністю шлункового соку та за умов введення мультипробіотика «Симбітер®»

Для нейтралізації надлишкової ліпопероксидації і підтримання стаціонарної внутрішньоклітинної концентрації вільних радикалів і ліпоперекисів у організмі існують ферментні та неферментні системи АОЗ. До ферментативних антиоксидантних систем відносять ферменти, що інактивізують вільні радикали і перекиси (супероксиддисмутази, каталазу, глутатіонпероксидазу та інші пероксидази) та відновні ферменти, що відновлюють окислені сполуки (глутатіонредуктазу, глюко-6-фосфатдегідрогеназу та ін.). До неферментативних антиоксидантів відносяться фітонутрієнти, вітаміни С і А, токофероли (α , β , γ і δ -сполуки токотрієнолів) каротини, флавоноїди, поліфеноли, мікроелементи, металопротеїни, і інші у тому числі, глутатіон, убіхінон, урати, що підтримують рівновагу між окисленими і відновленими формами кисню. Порушення функціонування системи АОЗ може приводити до додаткової генерації активних форм кисню (АФК) і є одним із проявів дихального стресу. В організмі існує певна рівновага між ферментативними й неферментативними елементами АОЗ. Співвідношення інтенсивності вільнорадикального окислення і антиоксидантної активності визначає так званий антиоксидантний статус клітини та організму в цілому [217].

Для сироватки крові характерна висока антиоксидантна активність через наявність у ній значної кількості низько- та високомолекулярних сполук як ферментативної, так і неферментативної природи [204].

Супероксиддисмутаза (СОД) є одною з ключових ланок АОЗ організму, яка здійснює перший метаболічний етап знешкодження супероксидного аніон радикалу шляхом його дисмутації в пероксид водню [218].

Введення лише СИМ не спричиняло змін активності СОД в сироватці крові щурів, порівняно з контролем (табл. 5.1.).

Таблиця 5.1.

Вміст відновленого глутатіону й активність антиоксидантних ферментів у сироватці крові щурів з тривалою шлунковою гіпоацидністю та за умов введення мультипробіотика «Симбітер®» ($M \pm m$, $n=10$)

Показники	Контроль	Симбітер	Омепразол	Омепразол + Симбітер
Активність супероксиддисмутази, ум. од./хв×мг білка	0,11±0,01	0,12±0,01	0,05±0,005*	0,08±0,008*/#/^
Активність каталази, нмоль/хв×мг білка	2,34±0,21	3,33±0,27*	7,29±0,71*	5,02±0,48*/#
Вміст відновленого глутатіону, GSH, нмоль/мг білка	0,259±0,017	0,239±0,022	0,218±0,018*	0,246±0,019
Активність глутатіонпероксидази, GSSG, нмоль/хв×мл	41,11±4,06	53,91±5,22*	57,56±5,68*	64,87±6,21#
Активність глутатіонтрансферази, GSR, нмоль/хв×мг білка	138,03±10,67	77,02±7,04*	181,71±15,78*	86,02±7,91*/#
Активність глутатіонредуктази, NADPH, нмоль/хв×мг білка	0,91±0,07	0,81±0,069	0,78±0,046*	0,98±0,078#

* – $p < 0,05$ порівняно з контролем;

– $p < 0,05$ порівняно з групою тварин, яким вводили омепразол;

^ – $p < 0,05$ порівняно з групою тварин, яким вводили «Симбітер®».

Тривале пригнічення шлункової секреції соляної кислоти супроводжувалось зниженням на 55 % ($p < 0,05$) порівняно з контролем активності СОД у сироватці крові щурів, що може свідчити про виснаження цього ферменту внаслідок посиленого синтезу АФК фагоцитуючими клітинами за умов запального процесу та розвитку дисбактеріозу в травному тракті на фоні гіпоацидного стану. Зменшення активності СОД може відбуватись і за рахунок інактивації цього ферменту перекисом водню, про накопичення якого в сироватці щурів цієї групи свідчить підвищення активності каталази. Окрім того, пригнічення ферментативної активності СОД може бути зумовлене

здатністю ОМ інактивувати одну з ізоформ СОД [219]. Зниження активності СОД також може бути пов'язане з окисними модифікаціями гістидинових залишків, що відповідають за зв'язування іонів міді та цинку в активному центрі ферменту. Так, під впливом вільних радикалів (зокрема перекису водню) залишок Гіс-118 окиснюється до 2-оксигістидину, інші гістидинові залишки – перетворюються в аспартат або аспарагін [218, 220]. Відомо також, що порушення функціонування СОД призводить до накопичення супероксиданіону – вільного радикалу, який взаємодіючи з оксидом азоту, призводить до утворення пероксинітриту. Пероксинітрит – високотоксична сполука, яка здатна безпосередньо викликати апоптоз і некроз клітини шляхом пошкодження її ДНК [221].

Введення мультипробіотика СИМ за умов тривалого гіпоацидного стану супроводжувалось зростанням активності СОД на 60 % ($p < 0,05$) порівняно з групою щурів, яким вводили лише ОМ, але значень контрольної групи цей показник не досягав. Таке відновлення активності СОД на фоні відсутності надлишку ТБК-активних продуктів може свідчити про зниження рівня O_2^- в сироватці крові та усунення «оксидативного вибуху» фагоцитів, і, як наслідок: зменшення запального процесу.

СОД каталізує дисмутацію аніон-радикалу кисню в пероксид водню, котрий, як більш гідрофобна сполука, легко дифундує з клітини, та катаболізується за участю каталази або пероксидази. За умов накопичення в клітині, пероксид водню при взаємодії з супероксидним аніоном може утворювати гідроксил-радикал, який є достатньо потужним окисником і основним фактором окисної модифікації клітинних структур, що викликає значні пошкодження молекул ДНК та мутації, які можуть призводити до загибелі клітин, або їх злоякісного переродження. Крім того, пероксид водню є потужною месенджерною молекулою, котра викликає запуск проапоптичних сигнальних каскадів [222]. У захисті клітин від окисного стресу, викликаного високими концентраціями H_2O_2 , ключова роль належить каталазі [223].

Каталаза (КАТ) є гем-вмісним ферментом, що переважно локалізований в пероксисомах або мікропероксисомах, каталізує розклад пероксиду водню на воду та молекулярний кисень, захищаючи клітину від оксидативних пошкоджень [210].

Активність КАТ в сироватці крові щурів, які отримували лише мультипробіотик СИМ, підвищувалась на 42 % ($p < 0,05$) порівняно з контролем (табл. 5.1.). Незважаючи на падіння активності СОД, в сироватці крові щурів з тривалим пригніченням шлункової секреції соляної кислоти спостерігалось зростання на 211 % ($p < 0,05$) активності КАТ порівняно з контролем, що може свідчити про наявність перекису водню. Відомо, що H_2O_2 може утворюватись в ході спонтанної дисмутації радикалу супероксиду, який в цій групі тварин зростає через пригнічення активності СОД. Окрім того, перекис водню продукується і в реакції супероксидного радикалу з радикалом пероксиду, тому активність КАТ може зростати внаслідок активації обхідних шляхів утворення H_2O_2 [224, 225].

За умов тривалого гіпоацидного стану введення мультипробіотику СИМ супроводжувалось зниженням на 31 % ($p < 0,05$) активності КАТ в сироватці крові, порівняно з групою тварин, яким вводили лише ОМ, однак цей показник залишався збільшеним відповідно на 114,5 і 50,7 % ($p < 0,05$) порівняно з контролем та групою щурів, які отримували лише СИМ. На фоні відсутності змін вмісту ТБК-активних продуктів (див. рис. 5.3.) така активність КАТ може свідчити про наявність перекису водню в сироватці крові даної групи щурів, яке може бути пов'язано з безпосередньою дією досліджуваних препаратів, адже показано [225], що постійні невеликі концентрації H_2O_2 , які не впливають на пероксидацію ліпідів, сприяють різкому підвищенню рівня активності КАТ.

Важливу роль у реалізації антирадикального та антипероксидного захисту клітин відіграє глутатіонова система, до складу якої входять відновлений глутатіон (GSH) і комплекс ферментів – глутатіонпероксидази (ГП), глутатіонтрансферази (ГТ) та глутатіонредуктази (ГР). Компоненти глутатіонової ланки АОЗ інгібують більшість вільнорадикальних реакцій,

забезпечують безрадикальне відновлення ліпогідропероксидів, інактивують різноманітні токсичні речовини та сприяють підтриманню антиоксидантного гомеостазу [226]. Тому наступним завданням нашої роботи було дослідити стан глутатіонової системи АОЗ в сироватці крові щурів з тривалим пригніченням кислотоутворення в шлунку та за умов введення мультипробіотику СИМ.

Ключова роль в захисті клітин від оксидативного стресу належить трипептиду, редокс-регулятору клітинних функцій - глутатіону. Білогічна роль глутатіону надзвичайно велика і реалізується як шляхом активації GSH-залежних ферментних систем, так і безпосередньо системою GSH/GSSG: захист від активних форм кисню, відновлення та ізомеризація дисульфідних зв'язків, вплив на активність різноманітних ферментів, підтримка оптимального стану біомембран, реалізація коферментних функцій, участь в обміні ейкозаноїдів, функціонування в якості резерву цистеїну, участь в біосинтезі нуклеїнових кислот і, можливо, білків, участь в метаболізмі ксенобіотиків, підвищення резистентності клітин до інтоксикації та інших шкідливих впливів, стимуляція проліферації. Завдяки високому вмісту глутатіону в клітинах саме у відновленій формі, він здатен ефективно нейтралізувати активні форми кисню *in vivo*. У реакції з ONOO⁻ глутатіон утворює нітрозотіол, який потім розпадається з утворенням NO, тобто може відігравати не тільки детоксикаційну роль за умов оксидативного стресу, а відігравати важливу роль у транспорті оксиду азоту [227].

Дослідження вмісту GSH (табл. 5.1.) в сироватці крові не виявило достовірних змін цього показника в усіх дослідних групах тварин порівняно з контролем, крім щурів з 28-добовим пригніченням шлункової секреції соляної кислоти, в яких спостерігалось зниження його вмісту на 16 % ($p < 0,05$). Встановлений ефект може бути зумовлений, як підвищенням використанням глутатіону глутатіонзалежними ферментами (ГП, ГТ) а також діяльністю глутаредоксину [206], так і прямим окисненням чи відновленням глутатіоном SH-груп білків [226]. Однією із ймовірних причин такого виснаження може бути зниження активності ГР, яка відновлює GSSG до GSH. Цей фермент

використовує НАДФН, як відновний еквівалент, а вміст цієї сполуки, значно знижується за умов оксидативного стресу [228].

Глутатіон служить кофактором для ГП, яка здатна відновлювати як пероксид водню, так і органічні гідроперексиди, окислюючи глутатіон до GSSG [229]. Спорідненість ГП та перекису водню вища, ніж у каталази, тому вона здатна працювати за низьких концентрацій субстрату [230]. ГП елімінує перекиси стеринів, нуклеїнових кислот, білків, захищає лізосомальні мембрани від окислення. Крім того, відомо, що ГП здатна функціонувати як пероксинітритредуктаза, попереджуючи оксидативну та нітрозативну модифікації біомолекул. Активність ГП може регулюватись продуктами ПОЛ, активними формами кисню, стресовими чинниками через α -адренергічні рецептори, тирозиновим фосфорилуванням, а також концентрацією відновленого глутатіону в клітині. Остання визначається активністю ГР та вмістом НАДФН+Н⁺, який синтезується в пентозофосфатному циклі [227].

Введення мультипробіотика СИМ інтактним тваринам спричиняло зростання на 31 % ($p < 0,05$) активності ГП (табл. 5.1.), порівняно з контролем. Такий ефект може бути пов'язаний зі здатністю пробіотичних мікроорганізмів СИМ, як і інших пробіотиків [231, 232], стимулювати систему АОЗ, що на фоні відсутності запального процесу не є пошкоджуючим фактором для організму щурів. 28-добове пригнічення шлункової секреції соляної кислоти, зумовлене введенням ОМ, призводило до підвищення активності ГП на 40 % ($p < 0,05$) порівняно з контролем, що на фоні збільшення вмісту ТБК-активних продуктів (див. рис. 5.3.), активності каталази та зменшення вмісту GSH, відновний потенціал якого ГП використовує для відновлення H₂O₂, може свідчити про мобілізацію антиоксидантної системи захисту у відповідь на зростання рівня АФК, зокрема й пероксиду водню. Одночасне введення СИМ і ОМ на фоні відсутності в сироватці крові підвищення ТБК-активних продуктів (див. рис. 5.3.) та зменшення запального процесу внаслідок нормалізації мікробіоценозу травного тракту за умов шлункової гіпоацидності нормалізувало активність ГП.

ГТ – універсальні ферменти, які запобігають пошкодженню ДНК, мітохондрій та інших життєво важливих центрів клітини від реактивних метаболітів і в результаті значно збільшують стійкість клітини і організму в цілому [233]. На відміну від ГП, ГТ здатна метаболізувати шляхом кон'югації з GSH вторинні метаболіти. ГТ беруть активну участь в детоксикації канцерогенних та мутагенних речовин, продуктів окислювального стресу, відновлюють окиснені ацили фосфоліпідів до оксикислот [233, 234]. Детоксикацію речовин ГТ здійснює шляхом переносу на них іонів сірки з подальшим утворенням меркаптидів. GSH взаємодіє з кон'югованою сполукою з утворенням тіоефіру. Потім під впливом γ -мембранозв'язаного ферменту γ -глутамілтрансферази від тіоефіру відщеплюється залишок γ -глутамінової кислоти. Подальші перетворення глутатіонового кон'югату відбувається за дії цистеїніл- γ -дипептидази. При цьому відділяється гліцин, а тіоефір цистеїну, що залишився, ацетилюється до меркаптураної кислоти та виводиться з організму [220].

Введення мультипробіотика СИМ спричиняло зменшення активності ГТ на 43 % ($p < 0,05$) порівняно з контролем (табл. 5.1.), що може бути пов'язано зі зменшенням вмісту ТБК-активних продуктів (див. рис. 5.3.) та відсутності змін активності СОД в сироватці крові щурів даної групи. На відміну від групи тварин, яким вводили СИМ, в щурів з тривалою шлунковою гіпоацидністю активність ГТ зростала на 32 % ($p < 0,05$), порівняно з контролем, що за умов зростання вмісту ТБК-активних продуктів (див. рис. 5.3.) і можливого накопичення перекису водню свідчить про залучення цього ферменту до руйнування перекисів. Крім того відомо, що ГТ бере участь у детоксикації ліків [235, 236], тому зростання активності ГТ за умов 28-добового введення ОМ може бути також пов'язана з особливостями метаболізму цього препарату за участю глутатіону [237, 238]. Введення мультипробіотика СИМ за умов тривалого гіпоацидного стану призводило до зменшення активності ГТ на 39 % ($p < 0,05$) порівняно з контролем, що за умов нормалізації процесів ПОЛ (див. рис. 5.3.) і вмісту GSH може свідчити про модулюючий вплив

мультипробіотика СИМ, який знижує активність ГТ також при окремому введенні інтактним тваринам.

Рівень GSH в клітині підтримується двома шляхами: синтезом *de novo* з амінокислот-попередників глутамату, цистеїну та гліцину та шляхом відновлення окисленого глутатіону специфічним ферментом – ГР. Цей фермент регенерує GSH шляхом відновлення за допомогою НАДФН, як донора водню, дисульфідного зв'язку GSSG до сульфгідрильної форми, котра здатна знову вступати в антиоксидантні реакції [226]. ГР належать до складу однієї з важливих груп флавоферментів. Величина GSH-редуктазної активності може залежати від фізіологічних потреб клітини та регулюється її потребами у НАДФН. Відомо, що редукція еквівалентів речовин, необхідних для НАДФН-залежних реакцій анаболізму, забезпечує їх властивість бути субстратами ряду інших сполук, що містять дисульфідний зв'язок, і тому, крім основної функції – відновлення GSH, цей фермент здатен проявляти трансгідрогеназну, електронтрансферазну і диафоразну активності, хоча в значно меншій мірі. Активною є димерна форма ГР [239]. Як і всі редуктази, GSH-редуктаза інактивується після відновлення донору електронів - НАДФ. Доведено, що при збільшенні внутрішньоклітинного GSSG, GSH-редуктаза реактивується і внаслідок каталітичної реакції утворення GSH концентрація клітинного НАДФН зменшується [240].

Як видно з табл. 5.1. введення мультипробіотика СИМ інтактним щурам не викликало змін активності ГР, на відміну від гіпоацидного стану, викликаного 28-добовим введенням ОМ, за умов якого спостерігалось зменшення глутатіонредуктазної активності на 14 % ($p < 0,05$) порівняно з контролем. Отримані результати співвідносяться з вмістом GSH в даній групі тварин, тому можна припустити, що однією з причин зниження рівня GSH є порушення функціонування ГР. Зниження активності ГР можна пояснити кількома факторами. По-перше, порушення функціонування ГР може бути пов'язане з можливим утворенням пероксинітриту внаслідок збільшення в сироватці крові щурів з тривалою гіпоацидністю вмісту NO_2^- (рис. 5.2.) та накопичення АФК під

час зменшення активності СОД (табл. 5.1.) та зростання вмісту ТБК-активних продуктів (рис. 5.3.). З літературних даних відомо, що пероксинітрит може модифікувати тирозиновий залишок, що знаходиться у безпосередній близькості від сайту зв'язування окисленого глутатіону, внаслідок чого порушується приєднання субстрату до ферменту, а, отже, і його активність [241]. По-друге, процес відновлення GSSG залежить від наявності НАДФН, а його вміст в клітині зменшується в умовах оксидативного стресу [228]. Одночасне ж 28-добове введення СИМ і ОМ нормалізувало активність ГР, внаслідок чого відбувалось відновлення вмісту GSH в сироватці крові щурів.

Таким чином, за умов розвитку дисбактеріозу, гіпергастринемії та запалення внаслідок тривалого зниження шлункового кислотоутворення в сироватці крові щурів відбуваються зміни в функціонуванні системи АОЗ. Мультипробіотик СИМ може спричиняти протизапальний ефект шляхом збільшення антиоксидантних властивостей сироватки крові щурів з тривалою гіпоацидністю шлункового соку.

Отже, 28-добове пригнічення шлункової секреції соляної кислоти, викликане введенням омепразолу, спричиняє порушення мікробіоценозу в травному тракті, розвиток гіпергастринемії та морфологічні зміни в слизових оболонках шлунка та товстого кишечника за рахунок активації запальних процесів із залученням прозапальних цитокінів ФНП- α , ІЛ-1 β , ІФН- γ та ІЛ-6, оксиду азоту, порушення процесів перекисного окислення ліпідів, зміни у функціонуванні антиоксидантної системи в сироватці крові щурів. Введення мультипробіотика «Симбітер» за умов 28-добової шлункової гіпоацидності не лише запобігає розвитку дисбактеріозу, морфологічних змін у шлунку та товстому кишечнику, а й здійснює протизапальний ефект, внаслідок модулюючого впливу на вивільнення прозапальних цитокінів і оксиду азоту, нормалізації процесів перекисного окислення ліпідів і функціонування системи антиоксидантного захисту в сироватці крові щурів.

РОЗДІЛ 6

**ВМІСТ НІТРИТ-ІОНІВ, ТБК-АКТИВНИХ ПРОДУКТІВ,
ВІДНОВЛЕНОГО ГЛУТАТІОНУ, АКТИВНІСТЬ СИНТАЗИ ОКСИДУ
АЗОТУ Й АНТИОКСИДАНТНИХ ФЕРМЕНТІВ У СЛИЗОВИХ
ОБОЛОНКАХ ШЛУНКУ ТА ТОВСТОГО КИШЕЧНИКА ЩУРІВ З
ТРИВАЛОЮ ШЛУНКОВОЮ ГІПОАЦИДНІСТЮ ЗА УМОВ ВВЕДЕННЯ
МУЛЬТИПРОБІОТИКА «СИМБІТЕР®»**

6.1. Активність синтази оксиду азоту та вміст нітрит-іонів у слизових оболонках шлунка та товстого кишечника щурів з тривалою шлунковою гіпоацидністю та за умов введення мультипробіотика «Симбітер®»

NO є одним з головних посередників різних фізіологічних і патофізіологічних реакцій в шлунково-кишковому тракті. В організмі ссавців існує два взаємопов'язаних шляхи біосинтезу NO: нітритредуктазний і нітроксидсинтетазний. Перший забезпечує утворення NO в результаті відновлення іонів нітратів і нітритів в умовах дефіциту кисню за рахунок активації нітритредуктазних систем, пов'язаних з гемвмісними білками: гемоглобіном, міоглобіном, цитохромоксидазою і цитохромом P-450. Другий – в присутності кисню з L-аргініну за участі групи трьох ізоферментів нітрооксидсинтаз (NO-синтаз, NOS), які кодуються різними генами: нейрональної (nNOS) і ендотеліальної (eNOS) конститутивних NO-синтаз та індукцибельної NO-синтази (iNOS) [242]. Класичними є уявлення про те, що малопродуктивні конститутивні форми NO-синтаз активно функціонують у фізіологічному режимі, індукцибельна NO-синтаза, яка продукує на порядок вищий рівень NO, активується за різних патологічних станів [243].

Функціонування конститутивних NO-синтаз забезпечує захист слизових оболонок травного тракту за допомогою різних механізмів, зокрема: регуляції кровопостачання [244, 245], модуляції адгезії запальних клітин і тромбоцитів [246], захисту від окисного стресу через здатність NO бути акцептором вільних радикалів та активувати антиоксидантну систему захисту [247], регуляції

запальних процесів за рахунок здатності пригнічувати синтез прозапальних факторів та впливати на активацію ядерного фактора NF κ B [248], захисту від патогенних мікроорганізмів, внаслідок забезпечення бактерицидної дії слизу за участі NO [249], посилення секреції слизу [250] та моторики в травному тракті [251, 252, 253], антиапоптичної дії на клітини слизових оболонок [254] тощо. Крім того, відомо, що NO регулює секрецію кислоти [255] та стимулює синтез гастрину G-клітинами в шлунку [79, 253].

Великі концентрації NO, утворені внаслідок активації iNOS, здійснюють пошкоджуючий вплив, зокрема шляхом: збільшення проникності судин та епітелію слизових оболонок травного тракту [256], активації апоптичних [254] і запальних процесів, а також порушення процесів перекисного окиснення ліпідів з вивільненням і накопиченням вільних радикалів, які разом з NO здійснюють цитотоксичний і канцерогенний вплив за рахунок здатності інгібувати синтез та пошкоджувати ДНК, пригнічувати функції мітохондрій тощо [257, 258].

Мікроорганізми шлунково-кишкового тракту здатні сприяти синтезу NO, шляхом стимуляції бактеріальними продуктами iNOS багатьох клітин, в тому числі імунокомпетентних та епітеліальних [259], та безпосередньо синтезувати NO [260]. Крім того, нітрит-редуктаза мікроорганізмів каталізує перетворення нітратів в нітрити з утворенням нітрозосполук, які розглядають як один з основних етіологічних факторів ризику розвитку пухлин шлунка [261, 262].

Роль бактерій у продукуванні NO в шлунково-кишковому тракті, може бути вирішальною у визначенні його впливу на слизову оболонку травного тракту за умов розвитку різних патологічних процесів. Тому нами було досліджено NO-синтазну активність і вміст NO $_2^-$ у слизових оболонках шлунка та товстого кишечника щурів за умов порушення мікробіоценозу в травному тракті та введення мультипробіотика СИМ з метою його корекції на фоні тривалого пригнічення шлункової секреції соляної кислоти.

Введення мультипробіотика СИМ інтактним щурам призводило в шлунку (рис. 6.1.) та товстому кишечнику (рис. 6.2.) до підвищення активності NO-

синтази на 33 і 35 % ($p < 0,05$) та вмісту NO_2^- на 28 і 71 % ($p < 0,05$) відповідно, порівняно з контролем, що, ймовірно, пов'язане з імуномодулюючими властивостями СИМ та активацією імунної відповіді за участі NO. Високий рівень NO_2^- у товстому кишечнику може бути обумовлений здатністю пробіотичних мікроорганізмів СИМ генерувати NO, що корелює з іншими дослідженнями, в яких показана здатність пробіотиків синтезувати NO [263].

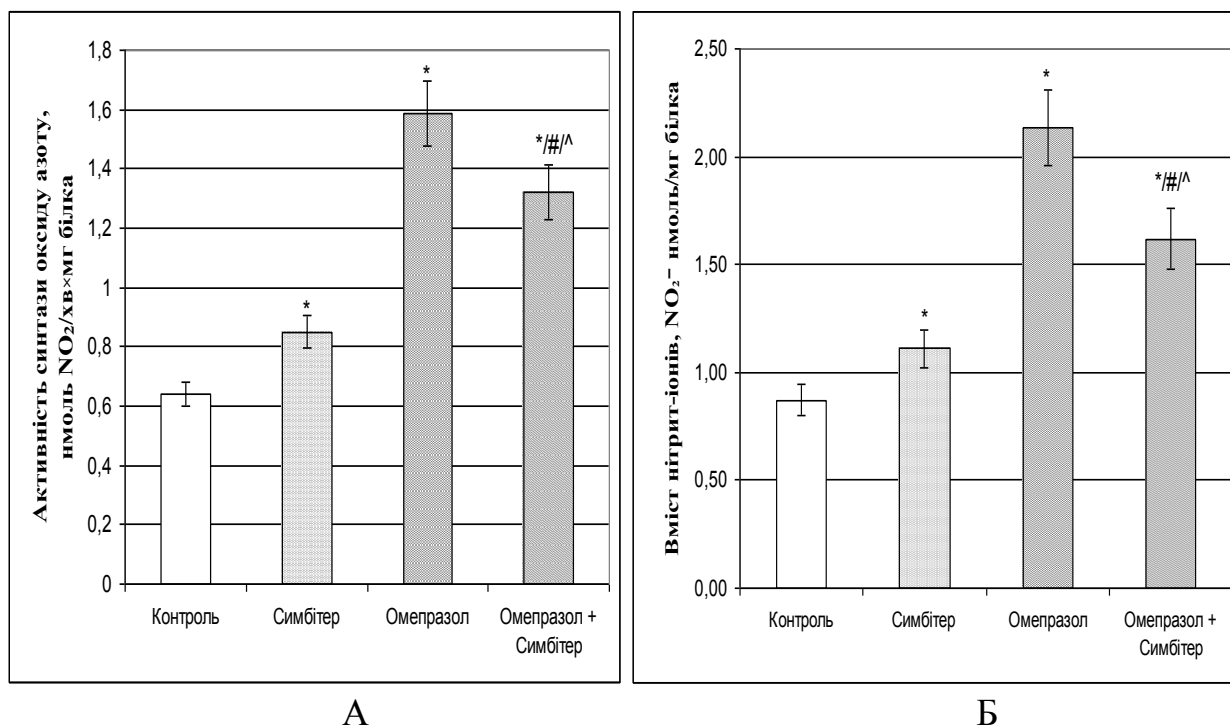


Рис. 6.1. Активність синтази оксиду азоту (А) та вміст нітрит-іонів (Б) у слизовій оболонці шлунка щурів з тривалою шлунковою гіпоацидністю та за умов введення мультипробіотику «Симбітер®» ($M \pm n$, $n=10$)

* – $p < 0,05$ порівняно з контролем;

– $p < 0,05$ порівняно з групою тварин, яким вводили омепразол;

^ – $p < 0,05$ порівняно з групою тварин, яким вводили «Симбітер®».

28-добове пригнічення шлункового кислотоутворення, викликане введенням ОМ, спричиняло зростання в шлунку та товстому кишечнику відповідно активності NOS на 148 і 115 % ($p < 0,05$) та вмісту NO_2^- на 150 і 158 % ($p < 0,05$) порівняно з контролем. Таке різке зростання активності NOS і

вмісту NO_2^- у шлунку та товстому кишечнику може свідчити про активацію iNOS, внаслідок розвитку дисбактеріозу та запалення в цих органах, що розвиваються під час тривалої шлункової гіпоацидності. На фоні підвищеного рівня прозапальних цитокінів у сироватці крові (див. рис. 5.1.) і посиленої інфільтрації лейкоцитів у слизових оболонках шлунка та товстого кишечника отримані результати свідчать про активне залучення NO до механізмів розвитку запалення та пошкодження слизових оболонок в досліджуваних органах травлення за умов тривалого гіпоацидного стану, які ми виявили при морфологічному дослідженні [161, 162, 163].

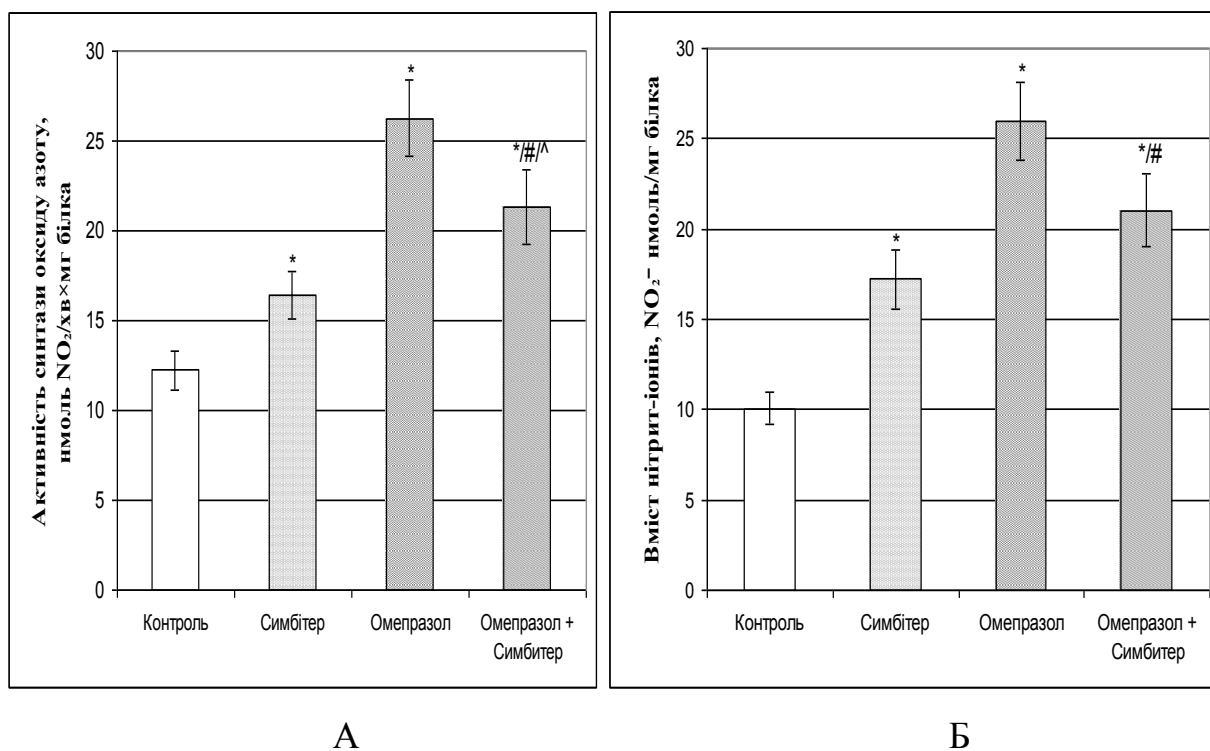


Рис. 6.2. Активність синтази оксиду азоту (А) та вміст нітрит-іонів (Б) у слизовій оболонці товстого кишечника щурів з тривалою шлунковою гіпоацидністю та за умов введення мультипробіотика «Симбітер®» ($M \pm n$, $n=10$)

* – $p < 0,05$ порівняно з контролем;

– $p < 0,05$ порівняно з групою тварин, яким вводили омепразол;

^ – $p < 0,05$ порівняно з групою тварин, яким вводили «Симбітер®».

Введення мультипробіотика СИМ з метою попередження та усунення дисбіотичних порушень в травному тракті за умов 28-добового пригнічення шлункової секреції соляної кислоти в щурів призводило до зменшення в шлунку та товстому кишечнику активності NO-синтази на 17 і 19 % ($p < 0,05$) та вмісту NO_2^- на 24 і 19 % ($p < 0,05$) відповідно, порівняно з групою тварин, яким вводили лише ОМ, але ці показники залишались вищими ніж у контролі та групи щурів, яким вводили лише СИМ. Зафіксований ефект може бути пов'язаний зі зниженням концентрації прозапальних цитокінів в сироватці крові даної групи тварин, які є сильними індукторами iNOS.

Отже, надмірний вміст NO, що утворювався внаслідок активації NOS, за умов 28-добової шлункової гіпоацидності може активно залучатись до процесів розвитку запалення, нітрозативного стресу та пошкодження слизових оболонок шлунку та товстого кишечника. Мультипробіотик СИМ за рахунок багатоконпонентного складу пробіотичних мікроорганізмів викликає активацію NO-синтаз та продукцію NO в шлунку та товстому кишечнику щурів, в тому числі за умов тривалого пригнічення шлункового кислотоутворення.

Баланс між фізіологічними, регуляторними та/або цитотоксичними властивостями NO в значній мірі обумовлений його локальною концентрацією, а також оксидантним статусом тканин, в яких він синтезується та реалізує свої ефекти [186, 187]. Тому наступним етапом наших досліджень було визначення продуктів перекисного окислення ліпідів та стану антиоксидантної системи в слизових оболонках шлунка та товстого кишечника щурів з тривалим гіпоацидним станом та за умов введення мультипробіотика СИМ.

6.2. Вміст ТБК-активних продуктів у слизових оболонках шлунка і товстого кишечника щурів з тривалою шлунковою гіпоацидністю та за умов введення мультипробіотика «Симбітер®»

В розвитку захворювань шлунково-кишкового тракту важливу роль відіграють порушення процесів ПОЛ та АОЗ [264, 265, 266]. Ліпопероксидація властива нормальним тканинам і відбувається, як правило, при побудові

ліпідних мембранних структур, їх оновленні, у ході біосинтезу ряду гормонів. Проте вільнорадикальне окислення може активізуватися при багатьох захворюваннях внутрішніх органів, в тому числі травного тракту. Надмірна активація процесів ПОЛ веде до порушення структури мембран, ліпідного обміну, здійснює токсичний вплив на тканини, сприяє посиленню лізису, окисленню сульфгідрильних груп білків і призводить до розвитку структурних змін при захворюваннях шлунково-кишкового тракту. Регуляція стаціонарної концентрації перекисів ліпідів у біологічних мембранах здійснюється внаслідок збалансованої взаємодії реакцій утворення цих продуктів – реакцій оксидації, а також механізмів контролю, які ведуть до пригнічення їх утворення, – реакцій антиоксидації. Дисбаланс у рівновазі між процесами ПОЛ і системою АОЗ, що виникає під час гіперпродукції вільних радикалів або падіння рівня тканинних антиоксидантів, зумовлює лавиноподібну реакцію переокиснення, яка призводить до загибелі клітин та пошкодження таканин [209, 267].

Одним із загальних механізмів пошкодження слизових оболонок шлунково-кишкового тракту при різних захворюваннях органів травлення є оксидативний стрес, в основі якого лежить універсальність вільнорадикальних реакцій, які підтримують прогрес захворювання та в подальшому забезпечують системний вплив на інші органи. Первинною реакцією в ланцюзі вільнорадикального окислення, яка призводить до деструкції ліпопротеїнового комплексу епітеліальних мембран, є ПОЛ. Кінцевий продукт процесів ліпопероксидації – малоновий діальдегід, як частина ТБК-активних продуктів, вміст яких корелює з рівнем ПОЛ [268].

Для дослідження стану системи ліпоперекисного гомеостазу за умов тривалої шлункової гіпоацидності та при введенні мультипробіотика СИМ нами було визначено вміст ТБК-активних продуктів у слизових оболонках шлунка та товстого кишечника.

Введення мультипробіотика СИМ інтактним щурам не спричиняло змін вмісту ТБК-активних продуктів у слизових оболонках шлунка (рис. 6.3.) та товстого кишечника (рис. 6.4.) порівняно з контролем.

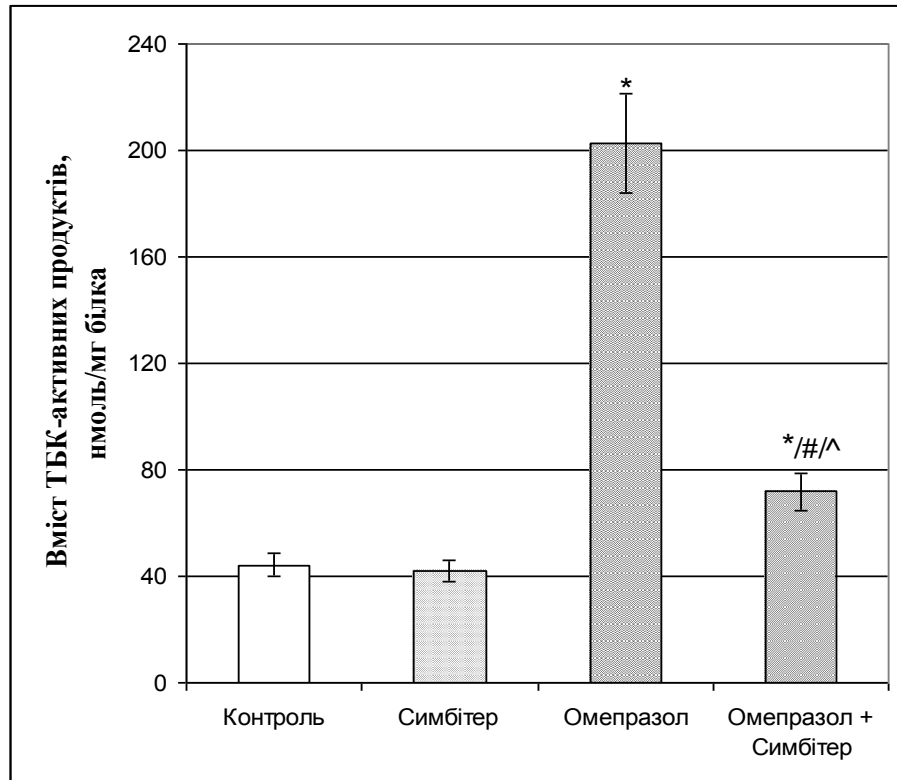


Рис. 6.3. Вміст ТБК-активних продуктів у слизовій оболонці шлунка щурів з тривалою шлунковою гіпоацидністю та за умов введення мультипробіотика «Симбітер®» ($M \pm n$, $n=10$)

* – $p < 0,05$ порівняно з контролем;

– $p < 0,05$ порівняно з групою тварин, яким вводили омепразол;

^ – $p < 0,05$ порівняно з групою тварин, яким вводили «Симбітер®».

28-добове пригнічення шлункової секреції соляної кислоти, викликане введенням ОМ, призводило до зростання вмісту ТБК-активних продуктів в слизових оболонках шлунка і товстого кишечника щурів відповідно в 4,6 та 1,6 рази ($p < 0,05$) порівняно з контролем, що свідчило про надмірну активацію процесів ПОЛ внаслідок порушення прооксидантно-антиоксидантної рівноваги та можливий пошкоджуючий вплив їх продуктів на слизові оболонки досліджуваних органів за умов розвитку запалення.

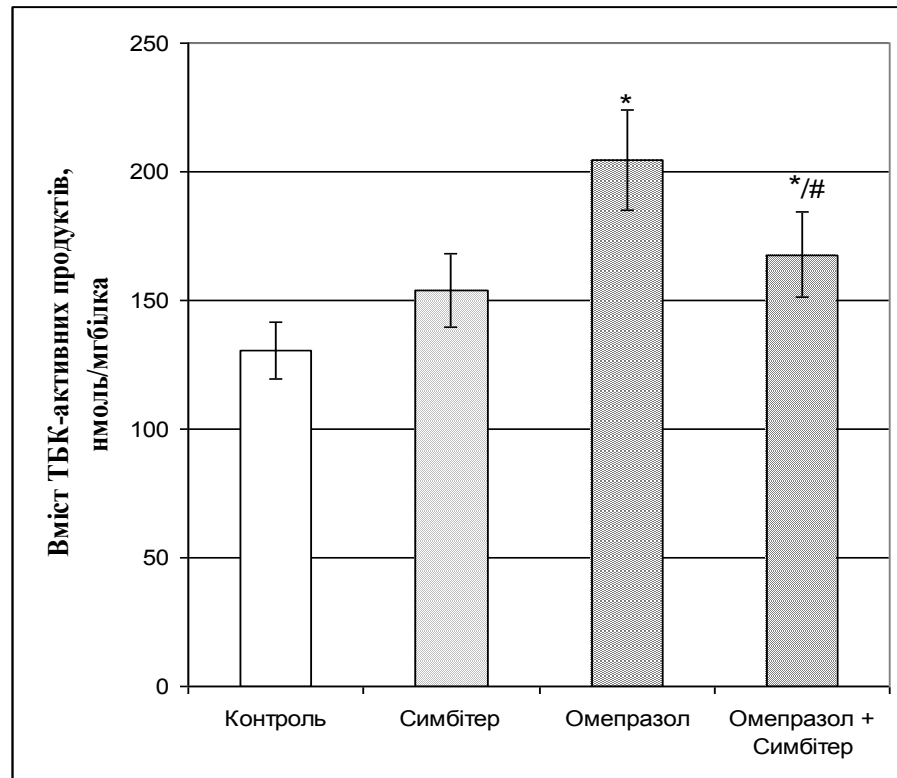


Рис. 6.4. Вміст ТБК-активних продуктів у слизовій оболонці товстого кишечника щурів з тривалою шлунковою гіпоацидністю та за умов введення мультипробіотика «Симбітер®» ($M \pm n$, $n=10$)

* – $p < 0,05$ порівняно з контролем;

– $p < 0,05$ порівняно з групою тварин, яким вводили омепразол.

Одночасне введення з ОМ мультипробіотика СИМ спричиняло зменшення вмісту ТБК-активних продуктів в слизових оболонках шлунка і товстого кишечника відповідно в 2,9 рази та на 18 % ($p < 0,05$) порівняно з щурами, яким вводили лише ОМ, але ці показники залишалися збільшеними порівняно з контролем та групою тварин, яким вводили лише СИМ. Отримані результати введення мультипробіотика СИМ на фоні зниженої шлункової кислотності корелюють з іншими дослідженнями впливу пробіотиків на процеси ліпопероксидації [269, 270] і можуть свідчити про зменшення інтенсивності процесів ПОЛ та усунення чи запобігання пошкоджуючого впливу їх токсичних продуктів на слизові оболонки шлунка і товстого кишечника щурів.

Таким чином, до розвитку запалення за умов тривалої шлункової гіпоацидності в слизових оболонках шлунка і товстого кишечника щурів активно залучені процеси ПОЛ, надмірна активація яких може призводити до розвитку окисного стресу та пошкодження в тканинах досліджуваних органів. Введення мультипробіотика СИМ за умов тривалого зниження шлункової секреції соляної кислоти спричиняло протизапальний та захисний ефекти, зокрема за рахунок зменшення інтенсивності процесів ПОЛ в слизових оболонках шлунка та товстого кишечника щурів.

Зростання вмісту продуктів перекисного окислення за умов тривалої шлункової гіпоацидності може бути також наслідком порушення функціонування системи антиоксидантного захисту в слизових оболонках шлунка та товстого кишечника. Тому нами було досліджено в слизових оболонках шлунка і товстого кишечника щурів з тривалою шлунковою гіпоацидністю та за умов введення мультипробіотика СИМ вміст відновленого глутатіону й активність антиоксидантних ферментів.

6.3. Вміст відновленого глутатіону й активність антиоксидантних ферментів у слизових оболонках шлунка та товстого кишечника щурів з тривалою шлунковою гіпоацидністю за умов введення мультипробіотика «Симбітер®»

За фізіологічних умов процес пероксидації ліпідів знаходиться під строгим контролем ферментативних та неферментативних систем антиоксидантного захисту, які здатні підтримувати прооксидно-антиоксидантний гомеостаз у внутрішньоклітинних і міжклітинних рідинах та ліпідних структурах мембран [267]. Важливим фактором, який визначає концентрацію вільних радикалів в клітинах слизових оболонок травного тракту, є кооперативна робота ферментів СОД, КАТ, ГП, ГТ і ГР. Початкові ж стадії процесу вільнорадикального окислення контролюються СОД і КАТ, які знешкоджують відповідно супероксидний аніон-радикал і пероксид водню. Послідовна робота цього

ферментативного ланцюга антиоксидантної системи забезпечує підтримку стаціонарного рівня концентрації вільних радикалів [271].

Мультипробіотик СИМ при окремому введенні інтактним тваринам не спричиняв змін активності СОД і КАТ у слизових оболонках шлунка (табл. 6.1.) та товстого кишечника (табл. 6.2.) щурів порівняно з контролем.

Таблиця 6.1.

Вміст відновленого глутатіону й активність антиоксидантних ферментів у слизовій оболонці шлунка щурів з тривалою шлунковою гіпоацидністю та за умов введення мультипробіотика «Симбітер®» ($M \pm m$, $n=10$)

Показники	Контроль	Симбітер	Омепразол	Омепразол + Симбітер
Активність супероксиддисмутази, ум. од./хв×мг білка	0,15±0,01	0,16±0,02	0,82±0,07*	0,37±0,03*/#/^
Активність каталази, нмоль/хв×мг білка	6,28±0,54	5,98±0,56	7,93±0,72*	6,78±0,61
Вміст відновленого глутатіону, GSH, нмоль/мг білка	21±1,9	25±2,2	13±1,1*	24±2,1#
Активність глутатіонпероксидази, GSSG, нмоль/хв×мг білка	6,4±0,58	5,8±0,52	2,7±0,22*	6,8±0,63#
Активність глутатіонтрансферази, GSR, нмоль/хв×мг білка	291±2,78	248±21,8	185±16,9*	261±24,2#
Активність глутатіонредуктази, NADPH, нмоль/хв×мг білка	131±11,2	115±9,8	87±7,9*	109±9,9#

* – $p < 0,05$ порівняно з контролем;

– $p < 0,05$ порівняно з групою тварин, яким вводили омепразол;

^ – $p < 0,05$ порівняно з групою тварин, яким вводили «Симбітер®».

Таблиця 6.2.

Вміст відновленого глутатіону й активність антиоксидантних ферментів у слизовій оболонці товстого кишечника щурів з тривалою шлунковою гіпоацидністю та за умов введення мультипробіотика «Симбітер®»

($M \pm m$, $n=10$)

Показники	Контроль	Симбітер	Омепразол	Омепразол + Симбітер
Активність супероксиддисмутази, ум. од./хв×мг білка	0,39±0,03	0,45±0,04	0,25±0,02*	0,49±0,04*/#
Активність каталази, нмоль/хв×мг білка	4,01±0,38	3,67±0,36	2,18±0,19*	3,59±0,31#
Вміст відновленого глутатіону, GSH, нмоль/мг білка	31,6±3,01	38,7±3,42*	25,4±2,44*	40,2±3,64*/#
Активність глутатіонпероксидази, GSSG, нмоль/хв×мг білка	4,5±0,36	5,1±0,48	5,6±0,52*	6,2±0,58*
Активність глутатіонтрансферази, GSR, нмоль/хв×мг білка	156±14,6	132±13,1	115±10,2*	106±8,8*
Активність глутатіонредуктази, NADPH, нмоль/хв×мг білка	212±18,1	187±16,4	162±16,1*	154±13,3*

* – $p < 0,05$ порівняно з контролем;

– $p < 0,05$ порівняно з групою тварин, яким вводили омепразол;

^ – $p < 0,05$ порівняно з групою тварин, яким вводили «Симбітер®».

Тривале пригнічення шлункової секреції соляної кислоти ОМ призводить до зростання активності СОД і КАТ в шлунку на 447 і 26 % ($p < 0,05$) та до зменшення активності цих ферментів на 36 і 46 % ($p < 0,05$) в товстому кишечнику відповідно порівняно з контролем. Отримані результати на фоні значного збільшення вмісту ТБК-активних продуктів та продукції NO можуть свідчити про розвиток окисного/нітрозативного стресу в слизових оболонках досліджуваних органів травлення, який пов'язаний також з дисбалансом в системі АОЗ в шлунку та виснаженням ферментів АОС в товстому кишечнику

за умов гіпергастринемії та дисбактеріозу під час зниженої шлункової кислотності. Так, у шлунку за умов значного зростання активності СОД, викликаного підвищенням виділення АФК внаслідок можливої індукції цитокінами $TNF-\alpha$, $IL-1\beta$ та $INF-\gamma$ [208], може відбуватись накопичення надлишку перекису водню внаслідок незначного зростання активності КАТ, яка його здатна відновлювати, або ж утворений в ході дисмутації супероксидного аніон-радикалу H_2O_2 знешкоджується за рахунок активації інших ланок АОС. Виснаження ж СОД і КАТ у товстому кишечнику на фоні зростання процесів ПОЛ (див. рис. 6.4.) і продукції NO (див. рис. 6.2.) може бути зумовлене накопиченням токсичних вільнорадикальних сполук та призводити до пошкодження слизової оболонки товстого кишечника.

Одночасне введення щурам з ОМ мультипробіотика СИМ порівняно з групою тварин, яким вводили лише ОМ, призводило до зменшення не лише інтенсивності процесів ПОЛ, а й зменшувало активність СОД в 2,2 рази ($p < 0,05$) і нормалізувало активність КАТ в шлунку та спричиняло зростання в товстому кишечнику активності СОД і КАТ на 96 і 65 % ($p < 0,05$) відповідно до рівня групи щурів, які отримували лише СИМ, і контролю. Отримані результати свідчать про здатність мультипробіотика СИМ за умов тривалої шлункової гіпоацидності спричиняти корегуючий вплив на функціонування досліджуваних ферментів АОЗ в слизових оболонках шлунка і товстого кишечника не лише через зменшення інтенсивності вільнорадикального окислення ліпідів внаслідок зменшення запалення та усунення порушень мікробіоценозу в травному тракті, а й за рахунок можливого безпосереднього знешкодження АФК і H_2O_2 та активації інших ланок системи АОЗ, зокрема ГП, пробіотичними молочно-кислими мікроорганізмами, що показано в інших дослідженнях антиоксидантних властивостей пробіотиків [212, 272].

Однією з ключових ланок АОЗ, що захищає клітини від оксидативного стресу, в тому числі й в травному тракті, є система глутатіону, яка містить GSH, ГП, ГТ, ГР і НАДФН, причому ГР і НАДФН необхідні для відновлення GSSH та його рециркуляції [226, 273]. Тому, наступним етапом нашого дослідження

було дослідити функціонування глутатіонової системи АОЗ у слизових оболонках шлунка і товстого кишечника щурів з тривалою шлунковою гіпоацидністю та за умов введення мультипробіотика СИМ.

Мультипробіотик СИМ за умов окремого введення інтактним щурам у слизовій оболонці шлунка не спричиняв змін вмісту GSH та активності ГР, ГП і ГТ порівняно з контролем (табл. 6.1.). У слизовій оболонці товстого кишечника окреме введення СИМ також не змінювало активність ГР, ГП і ГТ але збільшувало на 22 % ($p < 0,05$) вміст GSH порівняно з контролем (табл. 6.2.).

Тривале пригнічення шлункової секреції соляної кислоти, викликане введенням ОМ, у слизових оболонках шлунка та товстого кишечника відповідно призводило до односпрямованого зменшення порівняно з контролем вмісту GSH на 38 і 20 % ($p < 0,05$), активності ГР на 34 і 24 % ($p < 0,05$), ГТ - на 36 і 26 % ($p < 0,05$), окрім активності ГП, яка в шлунку зменшувалась на 58 % ($p < 0,05$), а в товстому кишечнику збільшувалась на 24 % ($p < 0,05$). Отримані результати дослідження свідчать про виснаження глутатіонової ланки АОЗ, внаслідок надлишкової активації вільнорадикальних процесів і ПОЛ, та неспроможність клітин протистояти розвитку оксидативного стресу в слизових оболонках шлунка та товстого кишечника за умов розвитку запалення під час гіпергастринемії та дисбактеріозу на фоні зниженої шлункової кислотності. Крім того, додатковою причиною виснаження глутатіонової системи АОЗ може бути безпосередній вплив ОМ, який, як показано в інших дослідженнях, перебуває в антагоністичних взаємозв'язках щодо регуляції активності H^+/K^+ -АТФази [274] та метаболізується за участі глутатіону [237, 238]. Отримані нами результати не корелюють з дослідженнями, в яких показані антиоксидантні властивості ОМ [275, 276], що може свідчити про визначальний негативний вплив на функціонування глутатіонової ланки АОЗ запалення та оксидативного/нітрозативного стресу, які розвиваються в слизових оболонках шлунка та товстого кишечника за умов гіпергастринемії та порушень мікробіоценозу в травному тракті на фоні тривалої шлункової гіпоацидності.

Введення щурам мультипробіотика СИМ за умов 28-добового пригнічення шлункової секреції соляної кислоти ОМ призводило до нормалізації вмісту GSH і активності досліджуваних глутатіонзалежних ферментів у слизовій оболонці шлунка та спричиняло зростання вмісту GSH на 27 % ($p < 0,05$) і активності ГП на 38 % ($p < 0,05$) на фоні зменшення ГР на 27 % ($p < 0,05$) і ГТ на 32 % ($p < 0,05$) у слизовій оболонці товстого кишечника порівняно з контролем. Зростання вмісту GSH та активності ГП, яка його використовує для відновлення пероксиду водню та органічних гідроперексидів, на фоні зниженої активності ГР може свідчити, як про активацію синтезу глутатіону *de novo* клітинами слизової оболонки товстого кишечника, так і про його продукцію пробіотичними мікроорганізмами СИМ, що також показано в інших дослідженнях [272, 277, 278, 279] здатності пробіотичних бактерій синтезувати глутатіон та його попередники. Збільшення ж активності ГП в слизовій оболонці товстого кишечника за умов незначного збільшення вмісту ТБК-активних продуктів і активності СОД може бути пов'язане з відновленням утвореного в ході дисмутації супероксид аніону пероксиду водню.

Дисбаланс функціонування та виснаження глутатіонової ланки системи АОЗ, СОД і КАТ у шлунку та товстому кишечнику щурів на фоні зростання процесів ПОЛ (рис. 6.3. і 6.4.) і продукції NO (рис. 6.1 і 6.2.) може свідчити про зниження антиоксидантного статусу слизових оболонок цих органів з розвитком в них оксидативного/нітрозативного стресу за умов запалення під час тривалої шлункової гіпоацидності. Введення мультипробіотика СИМ за умов тривалого гіпоацидного стану спричиняло нормалізацію антиоксидантного захисту слизових оболонок шлунка та товстого кишечника.

Таким чином, причиною підвищення рівня ПОЛ в шлунку та товстому кишечнику за умов тривалого пригнічення шлункової секреції соляної кислоти можуть бути як недостатня ефективність антиоксидантів, так і посилення генерації активних кисневих метаболітів та NO. Адже відомо, що ініціатором вільнорадикального окислення ліпідів за умов інфекційних захворювань травного тракту є надлишок активних форм кисню та азоту, які генеруються

фагоцитами [208]. Отримані нами результати свідчать про корегуючий вплив мультипробіотика СИМ на процеси ПОЛ та вільнорадикального окислення в шлунку та товстому кишечнику за умов запалення на фоні тривалої шлункової гіпоацидності в щурів, який, ймовірно, пов'язаний не лише з усуненням порушень кисневого метаболізму в фагоцитах, а й захистом слизових оболонок шлунка та товстого кишечника від пошкоджуючої дії активних форм кисню та азоту за рахунок нормалізації функціонування ферментів системи АОЗ та можливої здатності до продукції глутатіону.

Отже, розвиток запалення за умов гіпергастринемії та дисбактеріозу на фоні тривалої шлункової гіпоацидності в травному тракті зумовлений цілим рядом досліджених нами факторів, результат взаємодії яких призводить до виражених негативних змін в слизових оболонках шлунка і товстого кишечника. Мультипробіотик СИМ чинить захисний і протизапальний впливи за рахунок нормалізації процесів ПОЛ та функціонування системи АОЗ в слизових оболонках шлунка і товстого кишечника щурів за умов тривалого пригнічення шлункової секреції соляної кислоти, викликаного введенням ОМ.

Оскільки імунна система відіграє ключову роль у розвитку запалення, тому наступним етапом наших досліджень було визначення функціонального стану лімфоїдних клітин тимуса і селезінки щурів з тривалою шлунковою гіпоацидністю та за умов введення СИМ.

РОЗДІЛ 7

ЦИТОМОРФОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ТИМУСА ТА СЕЛЕЗИНКИ ЩУРІВ І ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН ЇХ ЛІМФОЇДНИХ КЛІТИН ЗА УМОВ ТРИВАЛОЇ ШЛУНКОВОЇ ГІПОАЦИДНОСТІ ТА ВВЕДЕННЯ МУЛЬТИПРОБІОТИКА «СИМБІТЕР®»

7.1. Цитоморфологічний стан тимуса та селезінки щурів з тривалою шлунковою гіпоацидністю за умов введення мультипробіотика «Симбітер®»

Вага та клітинність лімфоїдних органів є інтегральними показниками, що характеризують генералізовану реакцію імунної системи. При цьому необхідна інформативність досліджень забезпечується тільки при одночасному підрахунку обох показників, оскільки зміна ваги лімфоїдного органа може відбуватись не лише за рахунок лімфоїдних клітин, а й, наприклад, за рахунок епітеліальних клітин чи жирової тканини [280].

Одним із ключових лімфоїдних органів у розвитку імунної відповіді є тимус, основною функцією якого є дозрівання Т-лімфоцитів [281]. Окрім цього тимус також регулює рівень клітинного і гуморального імунітету шляхом експорту на периферію ефекторних і регуляторних клітин, а також біологічно активних медіаторів [282].

В контрольній групі щурів відносні вага (рис. 7.1.А.) та клітинність (рис. 7.1.Б.) тимуса становили відповідно $25 \pm 2,2 \times 10^{-4}$ і $60 \pm 5,5 \times 10^7$ ум. од. У щурів, яким вводили лише мультипробіотик СИМ, відносна вага тимуса не змінювалась і становила $21 \pm 1,9 \times 10^{-4}$ ум.од., на відміну від відносної клітинності цього органу, яка зростала на 40 % ($p < 0,05$) до $84 \pm 7,4 \times 10^7$ ум. од., порівняно з контролем. Встановлений ефект може бути пов'язаний з природною реакцією організму на введення хоч і корисних, але чужорідних мікроорганізмів у складі мультипробіотика, адже відомо, що пробіотичні мікроорганізми володіють штамоспецифічними імуномодулюючими

властивостями завдяки здатності викликати на себе імунну відповідь, в тому числі активацію Т-залежної ланки імунітету [80, 283].

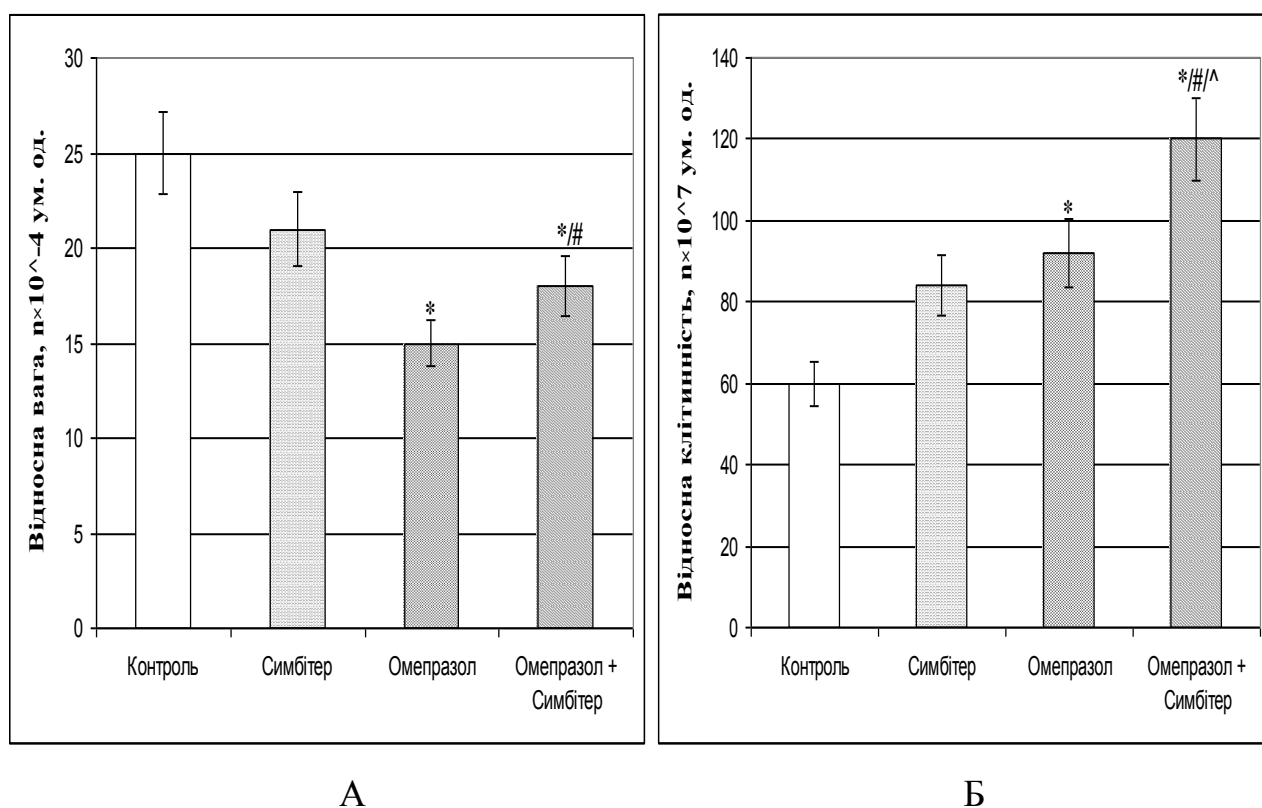


Рис. 7.1. Відносні вага (А) та клітинність (Б) тимуса щурів з тривалою шлунковою гіпоацидністю та за умов введення мультипробіотика «Симбітер®» ($M \pm n$, $n=10$)

* – $p < 0,05$ порівняно з контролем;

– $p < 0,05$ порівняно з групою тварин, яким вводили омепразол;

^ – $p < 0,05$ порівняно з групою тварин, яким вводили «Симбітер®».

Гіпоацидний стан шлункового соку, викликаний 28-добовим введенням щурам ОМ, супроводжувався зменшенням відносної ваги тимуса на 32 % ($p < 0,05$) до $15 \pm 1,2 \times 10^4$ ум. од. та одночасним підвищенням на 53 % ($p < 0,05$) до $92 \pm 8,3 \times 10^7$ ум. од. відносного вмісту лімфоїдних клітин в цьому органі порівняно з контролем.

Активация проліферативних процесів у тимусі щурів за умов тривалої гіпоацидності шлункового соку, ймовірно, пов'язана з розвитком клітинно-

опосередкованої імунної відповіді та необхідністю залучення до неї додаткового пулу Т-лімфоцитів. Крім того, існують дані, що в молекулі гастрину є фрагменти властиві тимусним гормонам [284], та про здатність цього гормону стимулювати імуногенез [285]. Тому посилення проліферації в тимусі під час тривалого пригнічення шлункової секреції соляної кислоти може відбуватись внаслідок трофічної дії гастрину, концентрація якого значно зростає за умов 28-добового введення ОМ (див. рис. 4.1.). Відомо, що тимус є одним з найбільш чутливих органів до впливу хімічних та фізичних факторів [281]. Незважаючи на це, деградація тимуса може відбуватись не тільки в результаті токсичної дії ОМ, а й за рахунок пригнічення міграції стромальних клітин з кісткового мозку під час анемії та необхідності постійного експорту на периферію ефекторних і регуляторних клітин з тимуса для залучення до імунної відповіді. Адже відомо, що крім розвитку хронічного запалення та дисбактеріозу, одним з основних негативних наслідків тривалої гіпоацидності шлункового соку є анемія [286, 287]. Отримані результати також корелюють з даними літератури про розвиток атрофії тимуса у тварин під час застосування аналогів ОМ – лансопразолу та тимопразолу [288, 289].

Введення ж разом з ОМ мультипробіотика СИМ спричиняло зростання відносної ваги тимуса на 18 % ($p < 0,05$) до $18 \pm 1,6 \times 10^{-4}$ ум. од порівняно з групою щурів, яким вводили ОМ, але значень контрольної групи тварин та щурів, яким вводили лише СИМ, цей показник не досягав. Відносна клітинність тимуса в цій групі щурів становила $120 \pm 10,1 \times 10^7$ ум. од., що більше в 2 рази ($p < 0,05$) ніж в контрольній групі, на 30 % ($p < 0,05$) порівняно з щурами з тривалим гіпоацидним станом та на 43 % ($p < 0,05$) порівняно з щурами, котрим вводили лише СИМ. Така цитоморфологічна реакція тимуса на введення СИМ за умов гіпоацидного стану може бути пов'язана з імуномодулюючими властивостями пробіотичних мікроорганізмів, які спричиняють активацію проліферативних процесів в тимусі для залучення нових Т-лімфоцитів до «боротьби» з запальними процесами та дисбактеріозом, що розвиваються на фоні тривалої гіпоацидності шлункового соку, спричиненої омепразолом.

Сенсибілізовані антигеном лімфоїдні клітини мігрують до вторинних лімфоїдних органів, включаючи селезінку. Мікрооточення селезінки сприяє міжклітинним контактам і генерації імунної відповіді. Головними подіями, які відбуваються в селезінці, є індукція Т-залежної В-клітинної імунної відповіді, генерація антитілопродукуючих В-лімфоцитів і проліферація CD8⁺ Т-лімфоцитів. Весь цей час селезінка перебуває у стані транзиторної спленомегалії, рівень якої пропорційний рівню активації імунної відповіді. Крім цього селезінка відіграє важливу роль як фільтруючий орган (знаходиться на гематогенних шляхах поширення антигену) та орган руйнування еритроцитів і тромбоцитів. Імунні реакції, що відбуваються в організмі, призводять до морфологічних змін в селезінці [169].

Відносні вага (рис. 7.2.А.) та клітинність (рис. 7.2.Б.) селезінки контрольної групи щурів відповідно становили $59 \pm 3,8 \times 10^{-4}$ і $98 \pm 8,7 \times 10^6$ ум. од.

Введення інтактним тваринам мультипробіотика СИМ не змінювало відносну вагу селезінки, котра становила $61 \pm 4,2 \times 10^{-4}$ ум. од., та збільшувало відносну клітинність на 107 % ($p < 0,05$) до $203 \pm 19,8 \times 10^6$ ум. од. порівняно з контролем. Зафіксоване нами посилення процесів проліферації лімфоїдних клітин селезінки може бути пов'язане з активацією мікроорганізмами СИМ не лише клітинної ланки імунітету, а й гуморальної відповіді на презентовані фагоцитуючими клітинами антигени мультипробіотика.

28-добове пригнічення шлункової секреції соляної кислоти ОМ у щурів призводило до помірної спленомегалії: збільшувались відповідно на 24 % ($p < 0,05$) до $73 \pm 5,5 \times 10^{-4}$ ум. од. і на 51 % ($p < 0,05$) до $148 \pm 12,7 \times 10^6$ ум. од. відносні вага та клітинність селезінки порівняно з контрольними тваринами. Така гіпертрофічна реакція селезінки, ймовірно пов'язана, як з посиленим виконанням фагоцитарної та імунної функцій, спрямованих на елімінацію чужорідних антигенів під час дисбактеріозу, так і з виконанням функції «гемокатерезу» під час руйнування еритроцитів в наслідок дефіциту заліза [290] та вітаміну В12 [286] в щурів з тривалою гіпоацидністю шлункового соку.

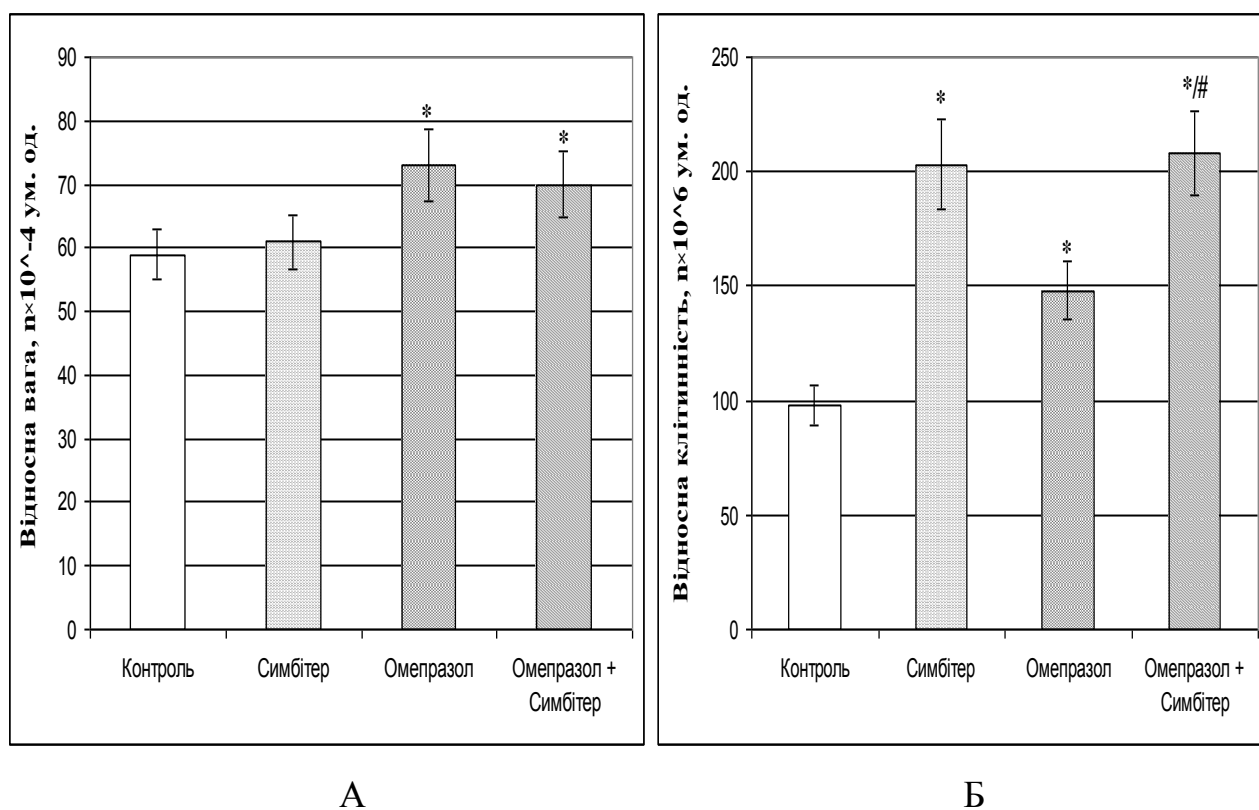


Рис. 7.2. Відносні вага (А) та клітинність (Б) селезінки щурів з тривалою шлунковою гіпоацидністю та за умов введення мультипробіотика «Симбітер®» ($M \pm n$, $n=10$)

* – $p < 0,05$ порівняно з контролем;

– $p < 0,05$ порівняно з групою тварин, яким вводили омепразол;

^ – $p < 0,05$ порівняно з групою тварин, яким вводили «Симбітер®».

Одночасне введення з ОМ мультипробіотика СИМ не змінювало відносну вагу селезінки, яка становила $70 \pm 5,3 \times 10^{-4}$ ум. од., порівняно з групою з тривалою гіпоацидністю та групою щурів, які отримували лише СИМ, та залишало збільшеним на 19 % ($p < 0,05$) цей показник порівняно з контролем. Відносна ж клітинність селезінки в цій групі щурів становила $208 \pm 18,5 \times 10^6$ ум. од., що більше на 40 % ($p < 0,05$) групи тварин, яким вводили лише ОМ, на 112 % ($p < 0,05$) контрольної групи та не відрізнялось від групи щурів, яким вводили лише СИМ. Отримані результати можуть свідчити про посилення експансії імунних клітин з розвитком проліферативних процесів в селезінці

внаслідок імуномодулюючої дії мультипробіотика СИМ за умов гіпоацидності шлункового соку в щурів.

Таким чином, тривале пригнічення шлункової секреції соляної кислоти призводило до гомеостатичних перебудов в тимусі та селезінці щурів, які, ймовірно, пов'язані з розвитком анемії, запальних процесів та дисбактеріозу в організмі цих тварин. Мультипробіотик СИМ викликав активацію проліферативних процесів в досліджуваних лімфоїдних органах, що може бути проявом імуномодулюючої дії цього препарату з залученням різних ланок імунітету для подолання негативних наслідків тривалої гіпоацидності шлункового соку в щурів.

7.2. Титр інтерферону в супернатантах клітинних культур тимоцитів і спленоцитів щурів з тривалим гіпоацидним станом та за умов введення мультипробіотика «Симбітер®»

Інтерферони (ІФН) – це клас клітинних глікопротеїнів, які продукуються клітинами у відповідь на інфекцію (вірусну, бактеріальну), інші стимули та виконують цілий ряд біологічних функцій [291]:

1. Протинфекційну: інгібування росту мікроорганізмів та ДНК- і РНК-вмісних вірусів.
2. Імуномодулюючу: підвищення активності ефektorів природного та специфічного імунітетів.
3. Антипроліферативну: пригнічення онкогенів, уповільнення мітотичного циклу та клітинної диференціації.
4. Індукція синтезу білків.
5. Антиангіогенну: пригнічення ангіогенезу.
6. Протипухлинну.

ІФН діляться на два основних серологічних типи. Перший – ІФН-1 включає в себе ІФН- α (лейкоцитарний), ІФН- β (фібробластний), ІФН- ω та ІФН- τ , тобто інтерферони, продукування яких індукується безпосередньо вірусами і пухлинними клітинами. На сьогодні описано 25 підтипів ІФН- α та ІФН- β . ІФН-

τ гомологічний до ІФН-α, ІФН-ω вивчений недостатньо. Другий тип – ІФН-2 представлений ІФН-γ (імунний інтерферон), який продукується Т-лімфоцитами та НК-клітинами. В більшості своїх біологічних властивостей ІФН-γ схожий на ІФН-1, проте його противірусна активність значно нижча, а імуномодулюючі властивості виражені в декілька разів сильніше [167, 292].

Розвиток багатьох патологічних процесів у організмі супроводжується змінами функціонального стану імунокомпетентних клітин [167].

ІФН регулюють імунну відповідь, виконуючи роль першого сигналу при активації лімфоцитів. Зв'язування ІФН зі специфічним рецептором на плазматичній мембрані запускає різні трансмембранні та внутрішньоклітинні процеси, котрі в кінцевому рахунку призводять до активації клітин [293, 294].

Нами було виявлено зростання концентрації ІФН-γ в сироватці крові щурів за умов окремого введення мультипробіотика СИМ та 28-добового гіпоацидного стану, порівняно з контролем, та зменшення цього показника за умов введення СИМ на фоні шлункової гіпоацидності, порівняно з групою тварин, яким вводили лише ОМ (див. рис. 5.1.). Тому для визначення ролі ІФН у механізмах розвитку запалення та імуномодулюючої дії мультипробіотика СИМ за умов тривалого пригнічення шлункової секреції соляної кислоти доцільним є визначення продукції ІФН лімфоїдними клітинами тимусу та селезінки, що відіграють одну з визначальних ролей у розвитку імунної відповіді організму.

Введення мультипробіотика СИМ інтактним щурам призводило до збільшення в 3 рази ($p < 0,05$) титру ендogenous ІФН в супернатанті клітинної культури виділених тимоцитів і в 2 рази ($p < 0,05$) індукованого ФГА та ЦФН титру ІФН, порівняно з контролем (рис. 7.3.).

Тривале пригнічення шлункової секреції соляної кислоти в щурів, викликане введенням ОМ, також спричиняло зростання в 2,5 рази ($p < 0,05$) спонтанної та в 1,5 і 2 рази ($p < 0,05$) індукованої ФГА і ЦФН відповідно продукції ІФН тимоцитами, порівняно з контролем. Одночасне введення щурам СИМ і ОМ спричиняло зростання ендogenous та індукованої ФГА і ЦФН

продукції ІФН в культурі виділених тимоцитів на рівні групи щурів, яким вводили лише мультипробіотик СИМ.

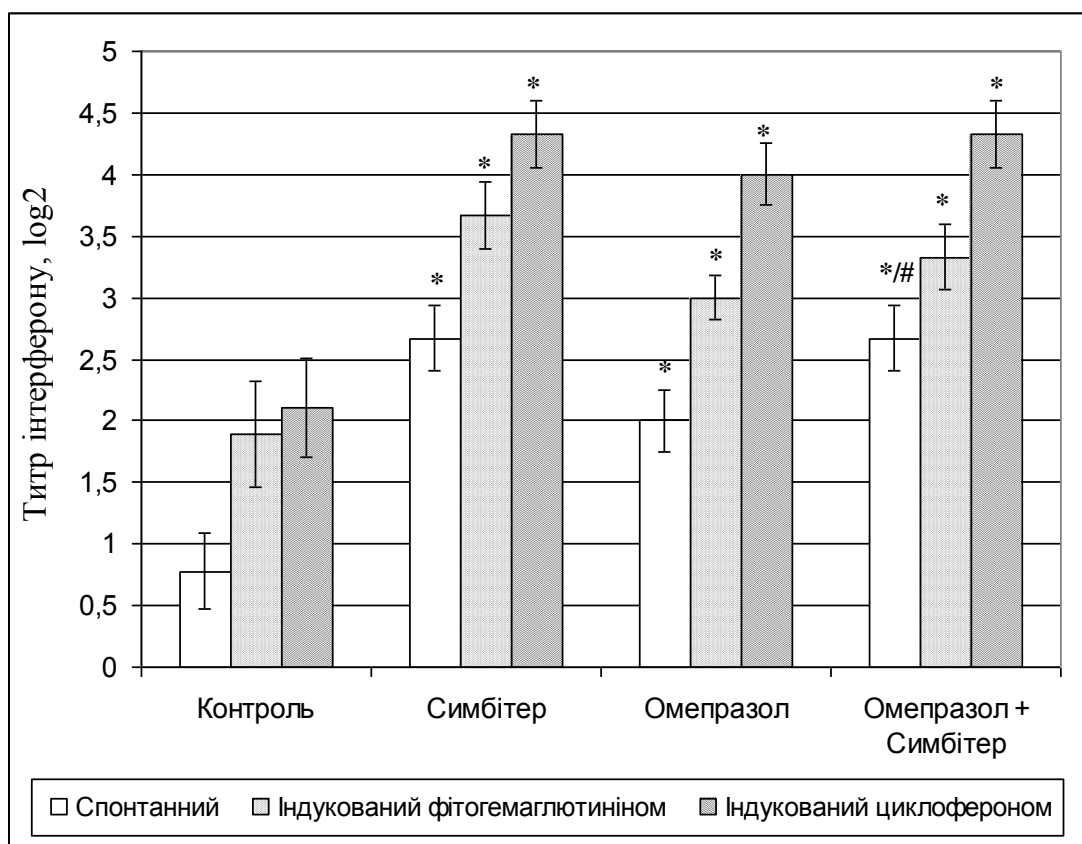


Рис. 7.3. Титр інтерферону в супернатанті клітинної культури тимоцитів щурів з тривалим гіпоацидним станом та за умов введення мультипробіотика «Симбітер®» ($M \pm m$, $n=10$).

* – $p < 0,05$ порівняно з контролем;

– $p < 0,05$ порівняно з групою тварин, яким вводили омепразол.

Отримані результати можуть свідчити про залучення лімфоцитів тимуса до клітинно-опосередкованої імунної відповіді як на введення пробіотичних мікроорганізмів, так і під час дисбактеріозу на фоні гіпоацидного стану, викликаного введенням ОМ, та достатньо велику резервну здатність до синтезу ІФН в цих клітинах. Причому введення мультипробіотика СИМ викликає більш виражений стимулюючий вплив на продукцію ендогенного та ФГА-індукованого ІФН в тимоцитах щурів, ніж введення ОМ, що на фоні збільшення

сироваткової концентрації ІФН- γ (див. рис. 5.1.) свідчить про його потужні інтерферогенні властивості.

Дослідження титру ІФН в культуральному середовищі спленоцитів щурів виявило однакове збільшення продукції ендogenous ІФН як за умов окремого, так і поєданого введення мультипробіотика СИМ та ОМ, порівняно з контролем (рис. 7.4.).

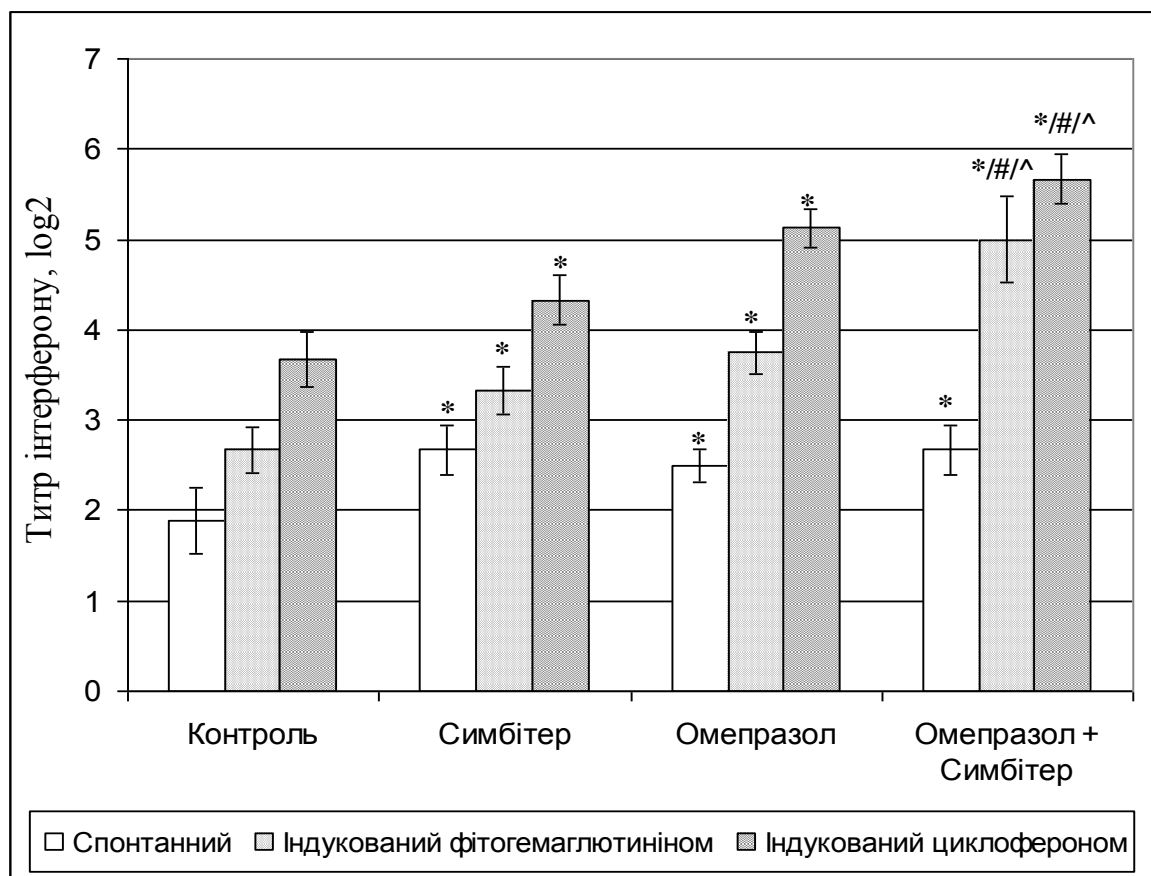


Рис. 7.4. Титр інтерферону в супернатанті клітинної культури спленоцитів щурів з тривалим гіпоацидним станом та за умов введення мультипробіотика «Симбітер®» ($M \pm m$, $n=10$).

* – $p < 0,05$ порівняно з контролем;

– $p < 0,05$ порівняно з групою тварин, яким вводили омепразол;

^ – $p < 0,05$ порівняно з групою тварин, яким вводили «Симбітер®».

Індукована ФГА та ЦФН продукція ІФН спленоцитами щурів, які отримували окремо СИМ та ОМ, зростала відповідно в 1,2 і 1,4 рази ($p < 0,05$),

порівняно з контролем. Введення ж мультипробіотика СИМ щурам за умов 28-добового пригнічення шлункового кислотоутворення спричиняло збільшення індукованого ФГА та ЦФН синтезу спленоцитами ІФН в культуральне середовище в 2 і 1,5 рази ($p < 0,05$) відповідно, порівняно з контролем.

Отримані результати дослідження ендogenous та індукованого ФГА і ЦФН титру ІФН у культуральному середовищі спленоцитів у щурів, яким вводили окремо та поєднано мультипробіотик СИМ і ОМ, подібні до таких у тимоцитів, і можуть свідчити про значні інтерферогенні властивості СИМ та активацію клітинної ланки імунної відповіді зі збільшенням резерву функціональної активності цих клітин. Виявлений нами ефект корелює з літературними даними про інтерферогенні властивості інших пробіотичних мікроорганізмів [283, 295].

Отже, зростання титру ІФН в культуральному середовищі тимоцитів і спленоцитів щурів, зміни сироваткової концентрації ІФН- γ (див. рис. 5.1.) свідчать про активне залучення цього цитокіну до механізмів запалення та імуномодуючої дії мультипробіотика СИМ під час гіпергастринемії та дисбактеріозу на фоні тривалої шлункової гіпоацидності. Мультипробіотик СИМ проявляє інтерферогенні властивості шляхом стимуляції синтезу ІФН лімфоїдними клітинами тимуса та селезінки щурів.

7.3. Активність 2',5'-олігоаденілатсинтетази в тимоцитах і спленоцитах щурів з тривалою гіпоацидністю шлункового соку та за умов введення мультипробіотика «Симбітер®»

За умов розвитку патологічного процесу важливим є визначення функціонування клітинних систем передачі сигналу. Інтерферозалежні регуляторні месенджерні каскади, зокрема система 2',5'-олігоаденілату, залучені до цілого ряду ефектів цього цитокіну: антивірусного захисту, контролю метаболізму, росту і диференціації клітин, онкогенної стабільності, апоптозу та ін. [296, 297]. Відомо, що 2',5'-олігоаденілат як вторинний посередник системи ІФН є медіатором клітинної відповіді на різні стресові

фактори, зокрема на інфекцію та дію канцерогенів [298]. Доведено також участь ключового ферменту даного каскаду - 2',5'-олігоаденілатсинтетази (2',5'-ОАС) у регуляції проліферативних, диференційних, апоптичних та пухлинних процесів [299, 300, 301].

В клітинах існує базальний рівень активності 2',5'-ОАС, проте спостерігається його значне зростання при дії ІФН та інших цитокінів, зокрема ФНП та ІЛ-1, а також при вірусній інфекції, онкогенних процесах, реакції клітин на зміну гормонального статусу тощо [297, 302]. Нами показано, що ІФН може бути залучений до процесів розвитку гіпергастринемії та запалення за умов 28-добового пригнічення шлункової секреції соляної кислоти та введення мультипробіотика СИМ, але залишається нез'ясованою можлива участь інтерферон-індукованих сигнальних систем у механізмах клітинної відповіді на введення СИМ, в тому числі за умов тривалої шлункової гіпоацидності.

Тому нами було визначено активність 2',5'-ОАС в тимоцитах і спленоцитах щурів, зокрема й за умов їх преінкубації *in vitro* з індукторами ІФН: ФГА та ЦФН.

Преінкубація тимоцитів *in vitro* з індукторами ІФН викликала зростання активності 2',5'-ОАС по відношенню до її значень у клітинах, які індукторами не оброблялися, причому такий ефект спостерігався для усіх груп тварин. В клітинах інтактних тварин при дії ФГА активність збільшувалась на 50 і 38 % ($p < 0,05$), при дії ЦФН – на 85 і 81 % ($p < 0,05$) відповідно в тимоцитах (рис. 7.5.) і спленоцитах (рис. 7.6.) щурів. Введення мультипробіотика СИМ інтактним щурам не спричиняло змін активності 2',5'-ОАС в тимоцитах і спленоцитах, в тому числі й за умов преінкубації *in vitro* цих клітин з індукторами ІФН, порівняно з контролем.

У щурів з тривалим пригніченням шлункової секреції соляної кислоти, викликаним введенням ОМ, була знижена активність 2',5'-ОАС відповідно в тимоцитах і спленоцитах на 29 і 16 % ($p < 0,05$), порівняно з інтактними тваринами. Введення ОМ щурам також спричиняло зниження стимуляції активності досліджуваного фермента у відповідь на дію індукторів ІФН *in vitro*

порівняно з інтактними тваринами в тимоцитах: ФГА на 41 % ($p < 0,05$), ЦФН – на 76 % ($p < 0,05$); та не змінювало ці показники в спленоцитах за дії індукторів порівняно з контролем.

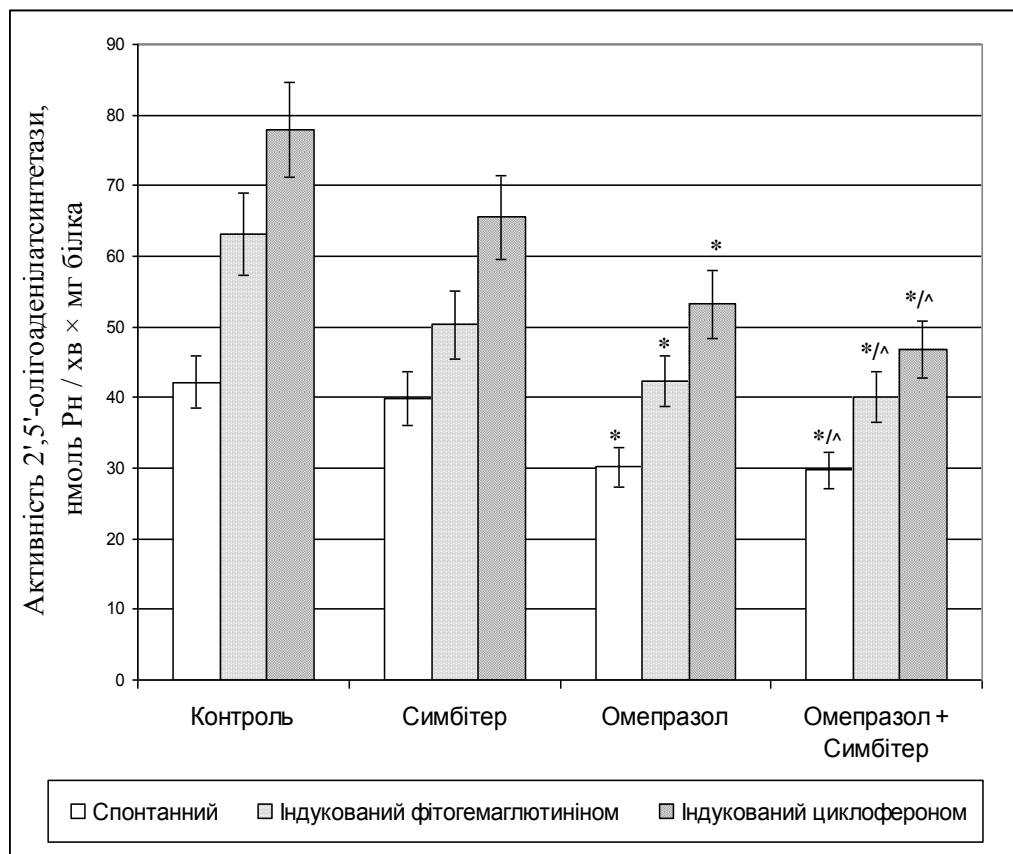


Рис. 7.5. Активність 2',5'-олігоаденілатсинтетази в тимоцитах щурів з тривалою гіпоацидністю шлункового соку та за умов введення мультипробіотика «Симбітер®» ($M \pm m$, $n=10$).

* – $p < 0,05$ порівняно з контролем;

^ – $p < 0,05$ порівняно з групою тварин, яким вводили «Симбітер®».

Незважаючи на збільшення титру ІФН в культуральному середовищі тимоцитів (див. рис. 7.3.) і спленоцитів (див. рис. 7.4.), за умов 28-добового пригнічення шлункового кислотоутворення ОМ в цих клітинах знижується активність 2',5'-ОАС та здатність до стимуляції цього показника при дії індукторів ІФН *in vitro* в тимоцитах. Отриманий ефект може бути обумовлений декількома причинами. По-перше, зниження активності 2',5'-ОАС може

відбуватись за рахунок пригнічення процесів трансдукції сигналу в інтерферон-індукованій системі 2',5'-олігоаденілату, внаслідок токсичної дії ОМ, який, потрапляючи в кров'яне русло, може легко розповсюджуватися в організмі та впливати на імунокомпетентні клітини, про що свідчать результати інших досліджень [303, 304], згідно яких ОМ пригнічує функції імунних клітин. Завдяки своїй високій ліпофільності ОМ може впливати на структуру мембран лімфоїдних клітин тимусу та селезінки, результатом чого можуть бути зміни трансдукції сигналу від рецептору інтерферону до індукованого ним ферменту - 2',5'-ОАС в цих клітинах. По-друге, порушення передачі сигналу в ІФН-індукованій сигнальній системі, зокрема на етапах від взаємодії ІФН з рецептором до стимуляції експресії гена 2',5'-ОАС, може відбуватись внаслідок впливу АФК, що можуть накопичуватись під час виникнення в імунних клітинах оксидативного стресу, що розвивається за умов дисбактеріозу та гіпергастринемії на фоні шлункової гіпоацидності. По-третє, цілком імовірно, виникнення зміни функціонування системи Jak/STAT, яка активується при зв'язуванні ІФН із мембранним рецептором, результатом чого є трансдукція сигналу в ядро й активація транскрипції генів-мішеней [305]. Адже показано, що передача сигналу гастрину реалізується через систему Jak2/STAT3, причому у гастрин-стимульованих епітеліальних клітинах ШКТ активність блокується Jak2-кінази та фосфатидилінозитол-3-кінази, що супроводжується змінами адгезії клітин [306]. Проте, роль білків Jak/STAT, які безпосередньо реалізують дію ІФН на клітини, у реакціях імунокомпетентних клітин за умов розвитку гіпергастринемії досі залишається нез'ясованою. Можна припустити, що при гіпергастринемії, викликаній введенням ОМ, блокується система Jak/STAT, в результаті чого пригнічується передача сигналу: ІФН зв'язується з рецептором, проте індукції синтезу 2',5'-ОАС не відбувається. Не слід також виключати, що вплив наслідків гіпоацидного стану, викликаного введенням ОМ, на лімфоцити може реалізуватись не через 2',5'-ОАС, а інші ключові ферменти системи ІФН. Загально визнано, що цей цитокін індукує цілий ряд білків, зокрема,

дволанцюгову РНК-залежну протеїнказу, Мх-білки, білки головного комплексу гістосумісності, NO-синтазу, Toll-like рецептори [307, 308, 309].

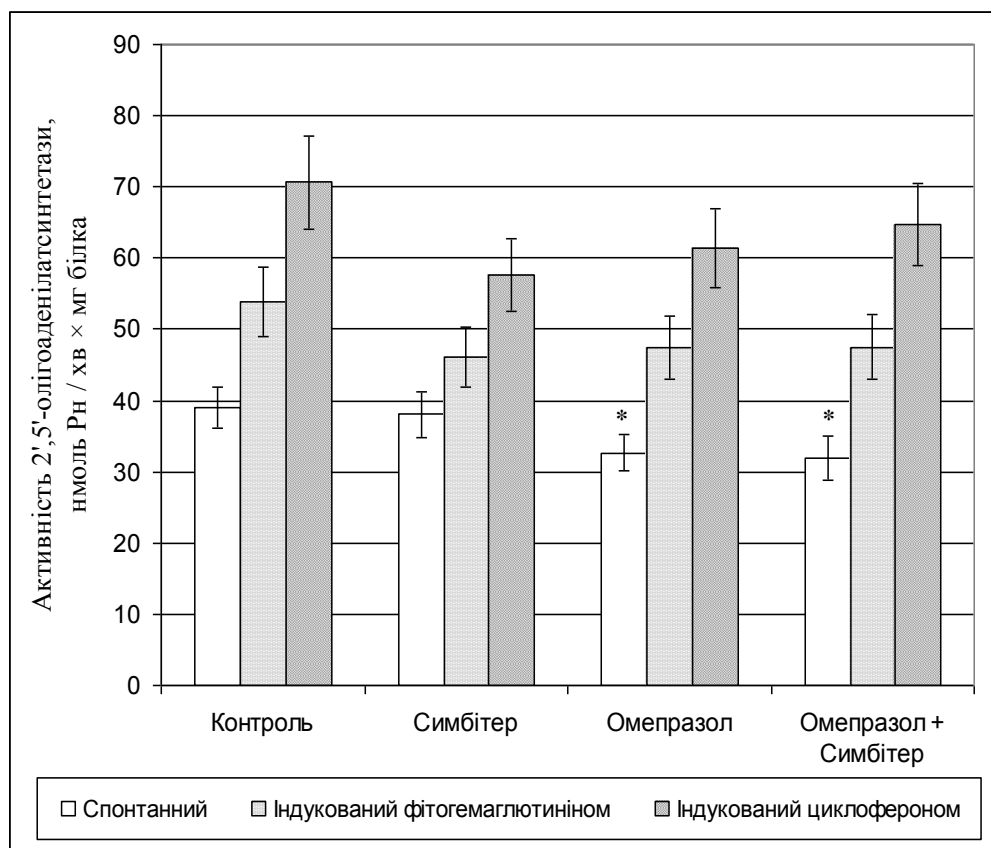


Рис. 7.6. Активність 2',5'-олігоаденілатсинтетази в спленоцитах щурів з тривалою гіпоацидністю шлункового соку та за умов введення мультипробіотика «Симбітер®» ($M \pm m$, $n=10$).

* – $p < 0,05$ порівняно з контролем.

Введення мультипробіотика СИМ за умов тривалої гіпоацидності шлункового соку, викликаній введенням ОМ, не змінювало рівень активності 2',5'-ОАС в тимоцитах і спленоцитах, в тому числі й при попередній інкубації цих клітин з індукторами ІФН, порівняно з групою щурів, яким вводили лише ОМ, що, не зважаючи на виражені інтерферогенні властивості цього препарату, може свідчити про відсутність впливу мультипробіотика СИМ на активність 2',5'-ОАС в імунокомпетентних клітинах тимуса та селезінки.

Таким чином, очевидно, що інтерферозалежний фермент 2',5'-ОАС тимоцитів і спленоцитів щурів, не зважаючи на інтерферогенні властивості СИМ, не залучений до механізмів імуномодуючої дії цього мультипробіотика, але зазнає впливу за умов 28-добового введення інгібітора протонної помпи-ОМ.

7.4. Активність синтази оксиду азоту та вміст нітрит-іонів у тимоцитах і спленоцитах щурів з тривалою шлунковою гіпоацидністю за умов введення мультипробіотика «Симбітер®»

NO – регуляторна молекула, яка синтезується більшістю імунокомпетентних клітин та вважається універсальним медіатором в імунній системі [188]. Загальновідомо, що NO відіграє одну з основних функцій у механізмах неспецифічного імунного захисту, забезпечуючи фагоцитоз за участі нейтрофілів і макрофагів та прозапальних цитокінів [167, 310]. ІФН- γ , ФНП- α та ІЛ-1 індуюють синтез NO не лише в макрофагах, а й в інших імунокомпетентних клітинах, в тому числі спленоцитах і тимоцитах [167, 311, 312].

Крім однієї участі в протиінфекційному захисті, NO регулює певні механізми розвитку гуморальної та клітинної імунної відповіді за рахунок впливу на Th1/Th2 баланс під час запалення [313, 314]. Залежно від типу та фази запальної реакції NO відіграє роль як протизапального, так і прозапального фактора [315]. Це пов'язано з тим, що розвиток запалення детермінується генерацією NO, що синтезується індукцибельною синтазою оксиду азоту (iNOS). В той же час NO-синтаза (NOS) контролює біосинтез інтерлейкінів ІЛ-4, ІЛ-11, ІЛ-13, які відносяться до інгібіторів запальної реакції [314]. Уявлення про подвійну роль NO в розвитку запалення (NO-парадокс) базуються на результатах, отриманих на різних експериментальних моделях, включаючи досліді на тваринах, у яких відсутній кодуючий ген iNO-синтази. Тому екстраполяція отриманих даних на моделювання запальних процесів будь-якої етіології потребує особливої обережності [316].

Відомо, що в імунних клітинах NO виконує регуляторні та сигналотрансдукуючі функції переважно шляхом ковалентної модифікації сірки цистеїну білків з утворенням S-нітрозотіолів (SNO) [317]. S-нітрозилування розглядають як NO-пов'язану функцію, що залучена до проліферації, диференціації, апоптозу макрофагів, тимоцитів, лімфоцитів периферичної крові, ендотеліальних клітин і взаємодії між імунними та іншими клітинами [318]. Крім того, NO є важливим фізіологічним регулятором функцій T-клітин [319], що регулює включення та передачу сигналу в цих клітинах [320].

NO і ONOO⁻, які утворюються при активації індукбельної ланки синтезу NO, можуть взаємодіяти з багатьма білками та ферментами, що важливі для передачі сигналів і життєдіяльності клітин, активувати молекули, котрі залучені до передачі цитокінового сигналу, зокрема JAK- або STAT-білки, шлях NFκB/IκB, а також MAPK, деякі G-білки та фактори транскрипції. Саме нітрозилування цистеїну в цих білках може призвести до їх активації чи інактивації [321, 322]. Крім того, показано, що NO і S-нітрозоглутатіон (GSNO) відіграють важливу роль в індукції апоптозу тимоцитів, пов'язаного з негативною селекцією тимоцитів, які експресують T-клітинні рецептори з високою афінністю до власних пептидів [323, 324].

Незважаючи на глибоке вивчення біохімічних механізмів дії NO, залишаються невідомими його рівень продукції та функції в тимусі та селезінці під час розвитку запалення та порушення мікробіоценозу в травному тракті на фоні тривалої шлункової гіпоацидності, в тому числі й за умов введення мультипробіотика «Симбітер®». Тому нами було досліджено активність NOS та вміст NO₂⁻ у тимоцитах і спленоцитах щурів за вищезгаданих умов.

Введення мультипробіотика СИМ інтактним щурам викликало в тимоцитах (рис. 7.7.) і спленоцитах (рис. 7.8.) зростання активності NOS на 11 і 36 % (p<0,05) та вмісту NO₂⁻ на 20 і 18 % (p<0,05) відповідно, порівняно з контролем.

Тривале пригнічення шлункової секреції соляної кислоти, викликане введенням ОМ, призводило до зростання в тимоцитах і спленоцитах відповідно

активності NOS на 50 і 75 % ($p < 0,05$) та вмісту NO_2^- на 53 і 58 % ($p < 0,05$), порівняно з контролем.

Введення мультипробіотика СИМ щурам разом з ОМ також призводило до підвищення порівняно з контролем відповідно в тимоцитах і спленоцитах активності NOS на 25 і 41 % ($p < 0,05$) та вмісту NO_2^- на 29 і 25 % ($p < 0,05$), але порівняно з групою тварин з гіпоацидним станом ці показники були відповідно нижчими приблизно на 20 % та достовірно не відрізнялись від показників у групі щурів, яким вводили лише СИМ.

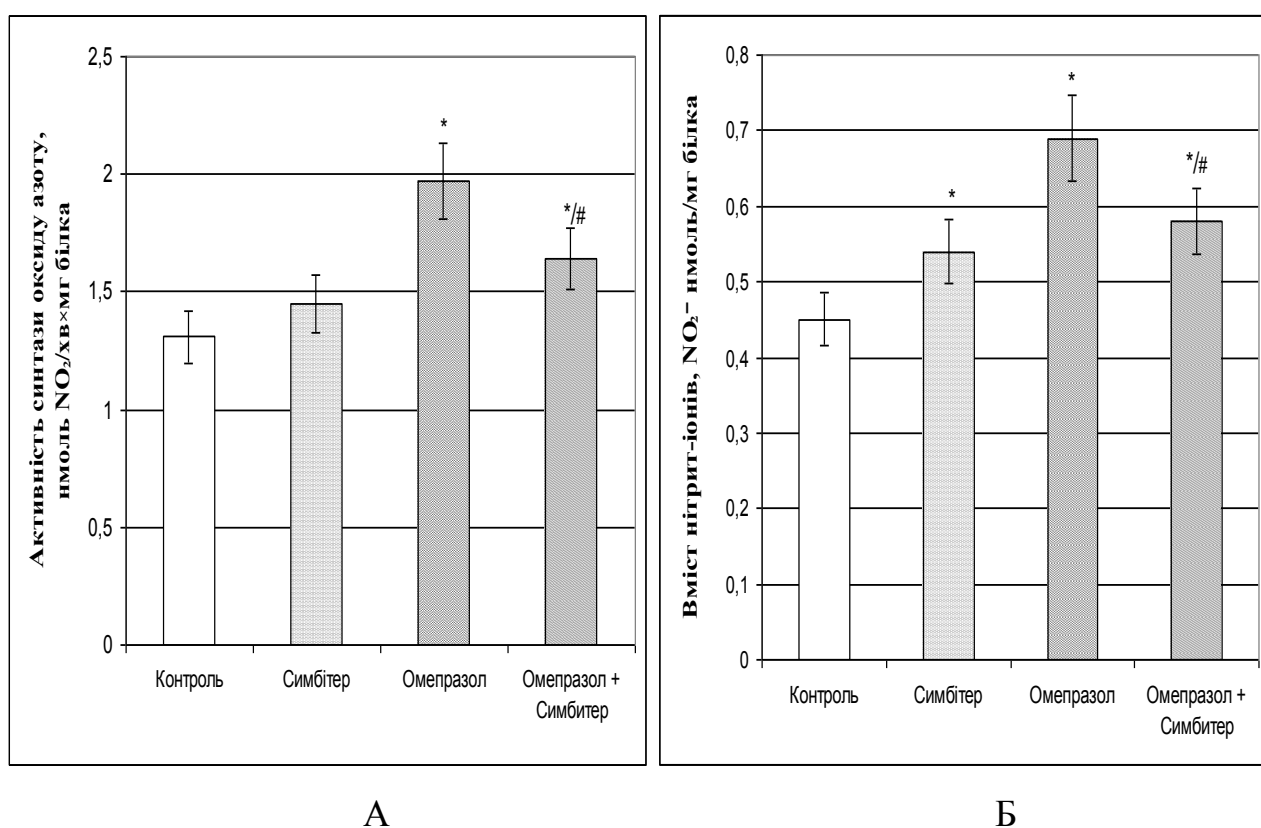


Рис. 7.7. Активність синтази оксиду азоту (А) та вміст нітрит-іонів (Б) у тимоцитах щурів з тривалою шлунковою гіпоацидністю за умов введення мультипробіотика «Симбітер®» ($M \pm m$, $n=10$).

* – $p < 0,05$ порівняно з контролем;

– $p < 0,05$ порівняно з групою тварин, яким вводили омепразол.

Зафіксоване нами зростання рівня продукції NO в тумусі та селезінці щурів усіх дослідних груп корелює зі збільшенням вмісту в тимоцитах (див.

рис. 7.3.) і спленоцитах (див. рис. 7.4) інтерферону, який є індуктором iNOS [325]. Крім того, вищий рівень активності NOS в спленоцитах ніж в тимоцитах, ймовірно, пов'язаний з антигенпрезентацією в селезінці фагоцитованих антигенів, в тому числі й пробіотичних мікроорганізмів СИМ, адже відомо, що фагоцити є найбільшими продуцентами NO [326].

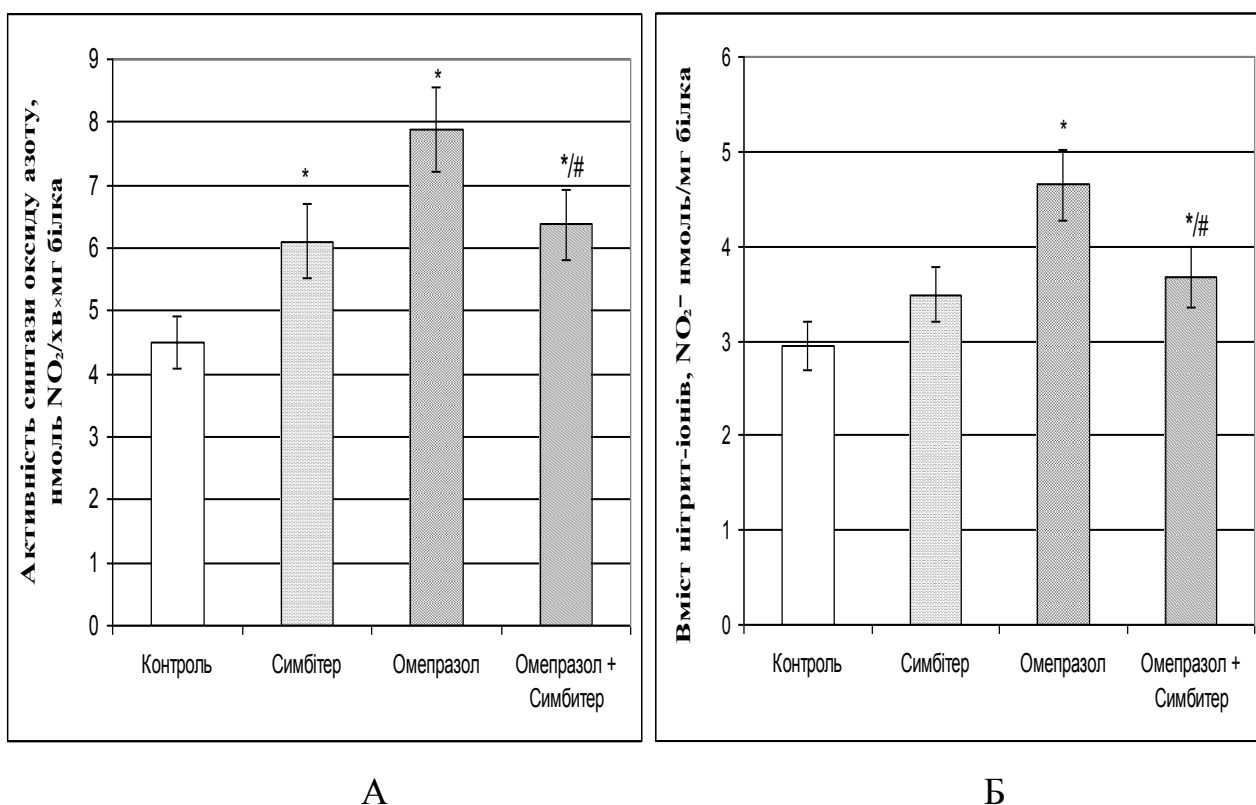


Рис. 7.8. Активність синтази оксиду азоту (А) та вміст нітрит-іонів (Б) у спленоцитах щурів з тривалою шлунковою гіпоацидністю за умов введення мультипробіотика «Симбітер®» ($M \pm m$, $n=10$).

* – $p < 0,05$ порівняно з контролем;

– $p < 0,05$ порівняно з групою тварин, яким вводили омепразол.

Аналіз отриманих результатів дослідження ативності NOS та вмісту NO_2^- дозволяє стверджувати про значне збільшення вмісту NO в тимусі та селезінці щурів за умов розвитку порушень мікробіоценозу в травному тракті на фоні 28-добової шлункової гіпоацидності. Виявлений ефект може бути зумовлений декількома причинами. По-перше, збільшення рівня NO в тимоцитах і спленоцитах може бути пов'язане з активацією імунної відповіді та запальних

процесів з метою елімінації чужорідних антигенів мікроорганізмів, які активно розмножуються в травному тракті за умов зниженої кислотності в шлунку (див. табл. 4.1 і 4.2). По-друге, за даних умов, імовірно, відбувається активація клітинної ланки імунітету, адже NO вибірково здатен посилювати проліферацію Th-1, активацію Т-клітин та регулювати продукцію цитокінів [194, 195, 196, 319, 320]. Додатковим доказом активації клітинно-опосередкованої імунної відповіді за даних умов також може свідчити зростання рівня ІФН- γ в сироватці крові (див. рис. 5.1.), продукції ІФН (див. рис. 7.3. і 7.4.) клітинами досліджуваних лімфоїдних органів і відносного вмісту лімфоїдних клітин в тимусі (див. рис. 7.1.Б.). Внаслідок цього може відбуватись посилення проліферативних процесів у тимусі для залучення нових лімфоцитів до імунної відповіді, що зазвичай, також супроводжуються збільшенням рівня NO-індукованого апоптозу, за допомогою якого гинуть Т-лімфоцити під час позитивної та негативної селекції [323]. По-третє, не можна виключати й те, що таке збільшення рівня продукції NO та його можливе накопичення в досліджуваних лімфоїдних органах щурів може бути пов'язане з розвитком імунної дисфункції за умов запалення [327], а також внаслідок дії ОМ, який, як відомо, може пригнічувати функції імунних клітин [304, 328]. Крім того, збільшення продукції NO в даній групі тварин, може впливати на рівень активації лімфоцитів за допомогою зворотніх порушень в Jak3/STAT5 сигнального шляху [329].

Введення мультипробіотика СИМ за умов тривалої шлункової гіпоацидності внаслідок усунення дисбіозу в шлунку і товстому кишечнику та зменшення запального процесу, запобігає надлишковій продукції NO в тимусі та селезінці щурів.

Таким чином, оксид азоту, що продукується тимоцитами та спленоцитами щурів за умов тривалої шлункової гіпоацидності та введення мультипробіотика СИМ, може приймати активну участь у нітрооксидзалежних механізмах протиінфекційної резистентності, регуляції імунних реакцій та реалізації NO-залежних ефектів у клітинах імунної системи організму.

7.5. Вміст ТБК-активних продуктів у тимоцитах і спленоцитах щурів з тривалою шлунковою гіпоацидністю та за умов введення мультипробіотика «Симбітер®»

Функціональна активація імунокомпетентних клітин є невід'ємною та необхідною частиною розвитку імунної відповіді на будь-який патологічний процес. Попередніми результатами наших та інших досліджень [75] було показано можливе залучення імунних клітин до розвитку запальних процесів під час гіпергастринемії та дисбактеріозу, що виникають внаслідок тривалої шлункової гіпоацидності.

На сьогодні встановлено, що формування імунної відповіді пов'язано зі змінами вільнорадикальних реакцій і станом антиоксидантної системи у різних клітинах. Показано протективний вплив антиоксидантів на імунологічну реактивність. Також визначена відповідність динаміки вільнорадикальних процесів у лімфоцитах з динамікою імунної відповіді на антигени [330]. Припускається, що на всіх етапах імунного реагування вільні радикали та їх похідні здійснюють регуляторну функцію та можуть сприяти пригніченню чи активації імунних реакцій за рахунок двох головних механізмів: зміни стану клітинних мембран і прямої інгібуючої дії на синтез ДНК. Показана також участь вільнорадикальних продуктів у реалізації кіллерної функції лімфоцитів, антимікробного захисту фагоцитами, лімфопроліферативної відповіді на мітогени, а також у розвитку імуносупресії при гіперактивації останніх [331]. Однак сьогодні залишаються не вивченими особливості вільнорадикальних процесів та їх вплив на реалізацію імунокомпетентними клітинами тимусу та селезінки своїх функцій за умов розвитку дисбактеріозу та гіпергастринемії на фоні тривалої шлункової гіпоацидності та введення мультипробіотичних препаратів.

Дослідження особливостей функціонування імунної системи за умов розвитку гіпергастринемії необхідне не тільки для розуміння закономірностей розвитку патологічного процесу, але і для прогнозування його перебігу, розробки та застосування відповідної імунокорегуючої терапії.

Нами було досліджено вміст ТБК-активних продуктів у тимоцитах і спленоцитах щурів з тривалим пригніченням шлункового кислотоутворення та за умов введення мультипробіотика СИМ з метою імуномодулюючої дії на процеси запалення, що розвиваються на фоні гіпергастринемії та дисбактеріозу в травному тракті при досліджуваній патології.

Вміст ТБК-активних продуктів в тимоцитах (рис. 7.9.) і спленоцитах (рис. 7.10.) щурів, яким вводили лише мультипробіотик СИМ, не відрізнявся від цього показника у контролі, що може свідчити про нормальне функціонування системи ПОЛ в досліджуваних лімфоїдних клітинах на фоні введення імуномодулюючих пробіотичних мікроорганізмів СИМ.

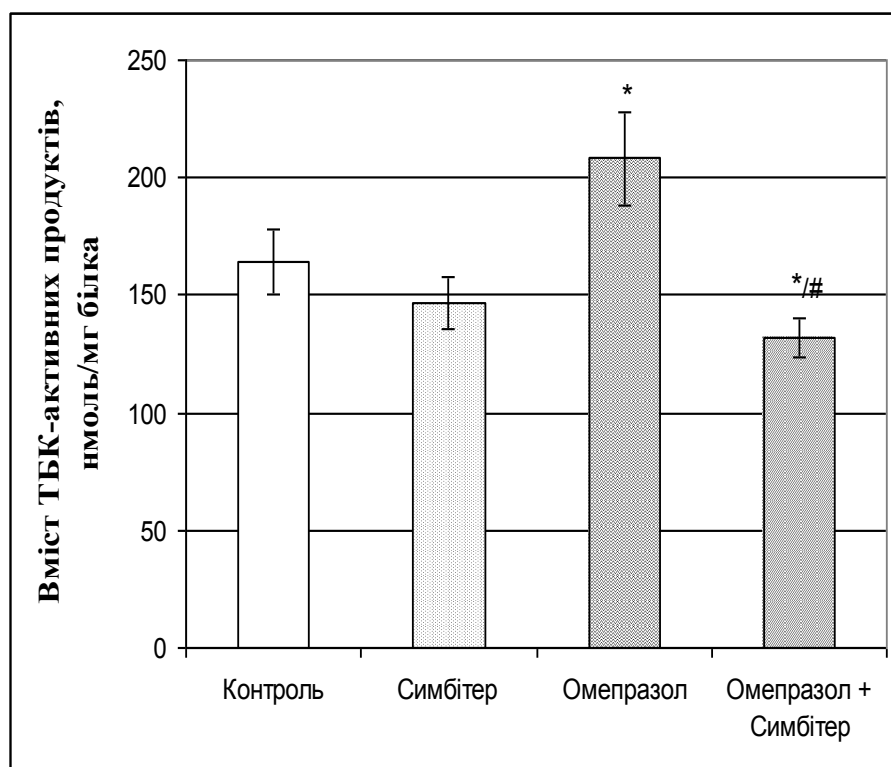


Рис. 7.9. Вміст ТБК-активних продуктів у тимоцитах щурів з тривалою шлунковою гіпоацидністю та за умов введення мультипробіотика «Симбітер®» ($M \pm n$, $n=10$)

* – $p < 0,05$ порівняно з контролем;

– $p < 0,05$ порівняно з групою тварин, яким вводили омепразол.

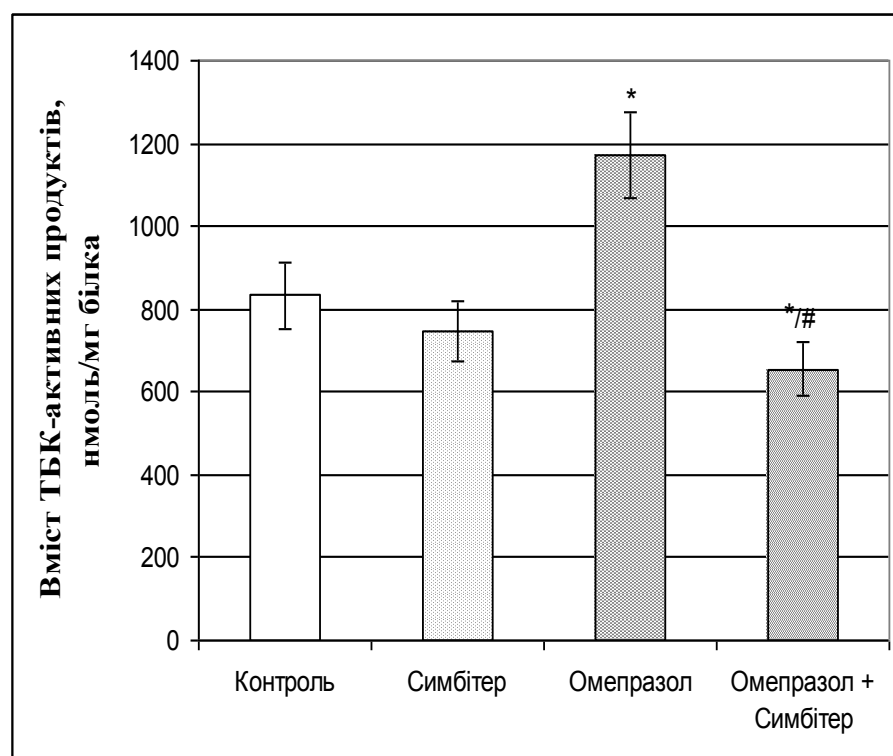


Рис. 7.10. Вміст ТБК-активних продуктів у спленоцитах щурів з тривалою шлунковою гіпоацидністю та за умов введення мультипробіотика «Симбітер®» ($M \pm n$, $n=10$)

* – $p < 0,05$ порівняно з контролем;

– $p < 0,05$ порівняно з групою тварин, яким вводили омепразол.

28-добове пригнічення шлункової секреції соляної кислоти призводило до збільшення вмісту ТБК-активних продуктів у тимоцитах і спленоцитах щурів відповідно на 27 і 41 % ($p < 0,05$) порівняно з контролем, що може свідчити про активацію процесів ліпоперекисного окиснення, з можливим порушенням функціональної активності та інтенсифікацією апоптичних процесів у цих клітинах. Активація процесів ПОЛ з накопиченням вільних радикалів на фоні зростання активності NOS і вмісту NO_2^- (див. рис. 7.7. і 7.8) може призводити до розвитку оксидативного/нітрозативного стресу в лімфоїдних клітинах тимусу та селезінки за умов запалення, викликаного дисбактеріозом і гіпергастринемією, які є наслідками тривалої шлункової гіпоацидності. Порівняно вищий вміст ТБК-активних продуктів у спленоцитах, ніж у тимоцитах, може бути пов'язаний з імовірною активацією фагоцитозу внаслідок

розвитку дисбіотичних порушень в травному тракті, який, як відомо, супроводжується «оксидативним вибухом» у фагоцитуючих клітинах з вивільненням супероксиданіонного радикалу в результаті активації гексозомонофосфатного шунта та окислення НАДФН ферментативним комплексом НАДФН-оксадазою [214].

Введення мультипробіотика СИМ за умов тривалого шлункового гіпоацидного стану викликало зниження вмісту ТБК-активних продуктів у тимоцитах і спленоцитах щурів відповідно на 37 і 44 % ($p < 0,05$) порівняно з тваринами, яким вводили лише ОМ, та на 20 і 21 % ($p < 0,05$) порівняно з контролем. Таке зниження вмісту ТБК-активних продуктів свідчить про здатність пробіотичних мікроорганізмів СИМ пригнічувати процеси ПОЛ з можливою активацією антиоксидантної системи в цих імунокомпетентних клітинах, що має позитивно впливати на їх функціональний стан за умов тривалої шлункової гіпоацидності.

Таким чином, 28-добове пригнічення шлункової секреції соляної кислоти спричиняє активацію процесів ПОЛ та утворення вільнорадикальних сполук, які можуть призводити до оксидативного/нітрозативного стресу в тимоцитах і спленоцитах щурів, що може негативно впливати на функціональний стан цих імунокомпетентних клітин. Мультипробіотик СИМ може здійснювати модулюючий вплив на функціональний стан тимоцитів і спленоцитів щурів за умов шлункової гіпоацидності, нормалізуючи процеси ПОЛ та кисневого метаболізму.

Загальновідомо, що здатність імунокомпетентних клітин швидко реагувати на будь-які зміни гомеостазу в організмі обумовлена специфічним метаболізмом цих клітин. Зміна активності ферментів АОС лімфоцитів є важливим показником їх функціонального стану та виявляється значно раніше, ніж змінюються їх основні морфологічні та біохімічні показники, тому ці клітини можна вважати зручною та важливою моделлю для досліджень функціонування системи АОЗ в імунокомпетентних клітинах за умов розвитку дисбактеріозу та гіпергастринемії, які виникають внаслідок тривалого

гіпоацидного стану в шлунку, та при введенні мультипробіотика СИМ з імуномодулюючою та бактерицидною метою.

7.6. Вміст відновленого глутатіону й активність антиоксидантних ферментів у тимоцитах і спленоцитах щурів з тривалою шлунковою гіпоацидністю та за умов введення мультипробіотика «Симбітер®»

Основну функцію захисту при активації процесів ПОЛ та вільнорадикальних реакцій у клітинах виконує АОС, недостатність функціонування якої є одним з факторів активації прооксидантних реакцій у організмі. Функціональний стан антиоксидантної системи в лімфоїдних клітинах визначає їх здатність до формування адекватної імунної відповіді, регуляції процесів активації та диференціації, стійкості до апоптозу [332, 333].

При дослідженні активності СОД у клітинах тимусу (табл. 7.1.) та селезінки (табл. 7.2) щурів за умов введення мультипробіотика СИМ не було виявлено змін цього показника порівняно з контролем, що на фоні відсутності змін вмісту ТБК-активних продуктів (див. рис. 7.9. і 7.10.), та незважаючи на виявлену нами активацію NOS у цих клітинах (див. рис. 7.7. і 7.8.), може свідчити про відсутність надлишку АФК та можливого їх негативного впливу на функціональну активність досліджуваних імунокомпетентних клітин.

28-добове пригнічення кислотоутворення в шлунку призводило до зменшення активності СОД у тимоцитах на 33 % ($p < 0,05$) та збільшення її активності в спленоцитах щурів на 49 % ($p < 0,05$) порівняно з контролем. Зниження активності СОД за вищезгаданих умов, імовірно, призводить до накопичення АФК в тимоцитах і може бути пов'язане як зі здатністю ОМ інактивувати одну з її ізоформ [219], так і з активацією апоптичних процесів внаслідок дії ОМ, який, як відомо, здатний викликати апоптоз лейкоцитів [328]. Крім того відомо [334], що швидкість реакції NO, кількість якого зростає в тимоцитах за даних умов (див. рис. 7.7.), з супероксидом у 3 рази вища, ніж швидкість взаємодії O_2^- з СОД, тому NO, вірогідно, конкурує з СОД за супероксид з можливим утворенням в результаті реакції з останнім токсичного

для тимоцитів пероксинітриду. Тому виснаження активності СОД на фоні збільшення вмісту ТБК-активних продуктів та активності NOS в тимоцитах щурів може призводити до накопичення АФК та порушення функціонального стану цих клітин під час розвитку імунної відповіді внаслідок активації запалення за умов дисбактеріозу та гіпергастринемії, викликаних введенням ОМ. На відміну від тимусу в імунокомпетентних клітинах селезінки активність СОД зростає, що може свідчити про залучення цього ферменту до стимуляції фагоцитарних процесів, які, ймовірно, активуються внаслідок розвитку дисбактеріозу на фоні тривалої шлункової гіпоацидності, з можливим накопиченням в спленоцитах перекису водню, як продукту дисмутації супероксидного аніону.

Таблиця 7.1.

Вміст відновленого глутатіону й активність антиоксидантних ферментів у тимоцитах щурів з тривалою шлунковою гіпоацидністю та за умов введення мультипробіотика «Симбітер®» ($M \pm m$, $n=10$)

Показники	Контроль	Симбітер	Омепразол	Омепразол + Симбітер
Активність супероксиддисмутази, ум. од./хв×мг білка	0,21±0,02	0,22±0,02	0,14±0,01*	0,18±0,01#
Активність каталази, нмоль/хв×мг білка	1,94±0,19	1,86±0,17	1,81±0,15	1,52±0,14*
Вміст відновленого глутатіону, GSH, нмоль/мг білка	1,88±0,14	2,09±0,16	1,52±0,13*	2,18±0,16#
Активність глутатіонпероксидази, GSSG, нмоль/хв×мг білка	1,21±0,11	1,32±0,11	0,92±0,08*	1,12±0,09#
Активність глутатіонтрансферази, GSR, нмоль/хв×мг білка	98,65±8,22	101,21±9,14	94,61±8,15	102,52±9,64
Активність глутатіонредуктази, NADPH, нмоль/хв×мг білка	30,56±2,94	28,82±2,08	23,53±2,11*	36,05±3,22#

* – $p < 0,05$ порівняно з контролем;

– $p < 0,05$ порівняно з групою тварин, яким вводили омепразол

Вміст відновленого глутатіону й активність антиоксидантних ферментів у спленоцитах щурів з тривалою шлунковою гіпоацидністю та за умов введення мультипробіотика «Симбітер®» ($M \pm m$, $n=10$)

Показники	Контроль	Симбітер	Омепразол	Омепразол + Симбітер
Активність супероксиддисмутази, ум. од./хв×мг білка	0,78±0,07	0,84±0,06	1,16±0,09*	0,89±0,07#
Активність каталази, нмоль/хв×мг білка	2,94±0,24	2,58±0,22	2,17±0,21*	2,38±0,22*
Вміст відновленого глутатіону, GSH, нмоль/мг білка	1,12±0,08	1,28±0,11	0,82±0,14*	1,18±0,12#
Активність глутатіонпероксидази, GSSG, нмоль/хв×мг білка	3,48±0,29	3,84±0,33	4,26±0,41*	3,91±0,37
Активність глутатіонтрансферази, GSR, нмоль/хв×мг білка	93,52±8,22	102,71±9,15	79,53±7,64	87,52±8,46
Активність глутатіонредуктази, NADPH, нмоль/хв×мг білка	23,32±1,84	24,47±2,11	27,73±2,65	26,52±2,72

* – $p < 0,05$ порівняно з контролем;

– $p < 0,05$ порівняно з групою тварин, яким вводили омепразол.

Введення СИМ щурам з тривалим гіпоацидним станом супроводжувалось нормалізацією активності СОД в імунних клітинах тимусу та селезінки.

Отримані результати досліджень активності СОД в лімфоцитах тимусу та селезінки можуть свідчити про активне залучення цього ферменту до механізмів розвитку запального процесу за умов 28-добового зниження кислотності в шлунку. Введення мультипробіотика СИМ за умов досліджуваної патології, можливо, здійснює опосередкований модулюючий вплив на активність СОД, шляхом зменшення утворення АФК в досліджуваних імунних клітинах, як внаслідок усунення дисбактеріозу – активатора запалення та

імунної відповіді, так і за рахунок можливої активації інших ланок системи АОЗ.

Оскільки СОД здійснює дисмутацію супероксидрадикалу в пероксид водню, який може катаболізуватись за участі КАТ [208], нами було досліджено активність останньої в тимоцитах і спленоцитах щурів з тривалою шлунковою гіпоацидністю та за умов введення мультипробіотика СИМ.

Введення СИМ інтактним щурам не призводило до зміни активності КАТ у тимоцитах (табл. 7.1.) і спленоцитах (табл. 7.2.), порівняно з контролем, що корелює з отриманими нами результатами дослідження активності СОД і ТБК-вмісних продуктів, які також не змінювались.

Тривалий гіпоацидний стан в шлунку щурів не спричиняв змін активності КАТ у тимоцитах та знижував її активність на 26 % ($p < 0,05$) в спленоцитах, порівняно з контролем, що може свідчити про виснаження цього ферменту внаслідок блокування взаємодії амінокислот аспарагіну 147 і гістидину 74 в активному центрі ферменту перекисом водню, який накопичується в спленоцитах в результаті високої активності СОД.

Введення мультипробіотика СИМ за умов тривалого зниження кислотоутворення в шлунку щурів, викликало зменшення порівняно з контролем активності КАТ в тимоцитах і спленоцитах, що на фоні відсутності надлишку ТБК-активних продуктів і нормального функціонування СОД у цих імунних клітинах може бути пов'язано зі зниженням рівня перекису водню або активацією його каталізу іншими ферментами АОС, зокрема ГП і ГТ.

Важливим компонентом АОС є глутатіонзалежна ланка, що включає глутатіон та глутатіонзалежні ферменти – ГП, ГТ і ГР, які активно протидіють оксидативному стресу в клітинах. Механізм дії природних антиоксидантів обумовлений їх здатністю до активного реагування з перекисними радикалами, в результаті чого відбувається їх трансформація з активних фенольних в неактивні хінонні форми [226]. Загальновідомо також, що глутатінопоередкована детоксикація відіграє ключову роль у забезпеченні резистентності клітин до цитопшкоджуючої дії продуктів ПОЛ, вільних

радикалів, алкілування білків, а також у попередженні пошкоджень ДНК. Крім цього, GSH розглядається в якості основного компоненту редокс-буферу клітини, що підтримує характерне для неї «відновне середовище» [206].

GSH – це найбільш важливий компонент антиоксидантної системи глутатіону, який швидко мобілізується в разі підвищеного вмісту пероксидів та відновлює їх у реакції, що супроводжується утворенням GSSH. Загальновідомо, що в умовах патології рівень глутатіону в значній мірі визначається змінами функціонування ферментних систем, які регулюють відношення його окисленої та відновленої форм [226].

На сьогодні, функціонування глутатіонової системи АОЗ досить детально вивчається за умов різних патологічних станів у організмі, проте залишаються нез'ясованими ефекти введення мультипробіотиків на стан глутатіонзалежної АОС та пов'язану з нею функціональну активність імунокomпетентних клітин, в тому числі тимусу та селезінки, за умов тривалого пригнічення шлункової секреції соляної кислоти. Тому нами було досліджено вміст GSH і активність ГП, ГТ, ГР в тимоцитах і спленоцитах щурів з тривалою шлунковою гіпоацидністю, викликаною введенням ОМ, за умов введення мультипробіотика СИМ.

Вміст GSH та активність досліджуваних глутатіонзалежних ферментів: ГП, ГТ і ГР у тимоцитах (табл. 7.1.) і спленоцитах (табл. 7.2.) щурів за умов введення лише мультипробіотика СИМ не змінювались порівняно з контрольною групою щурів, що на фоні відсутності змін вмісту ТБК-активних продуктів, активності СОД і КАТ може свідчити про нормальне фізіологічне функціонування системи АОЗ та відсутність негативного впливу СИМ на функціональний стан імунних клітин у тимусі та селезінці.

Тривала шлункова гіпоацидність спричиняла порівняно з контролем у тимоцитах і спленоцитах щурів відповідно зменшення вмісту GSH на 19 і 27 % ($p < 0,05$), не змінювала активність ГТ у клітинах обох органів; знижувала активність ГТ на 24 % ($p < 0,05$) і ГР на 23 % ($p < 0,05$) у тимоцитах; підвищувала

на 22 % ($p < 0,05$) активність ГП та не впливала на ГР у спленоцитах дослідних тварин.

Результати дослідження функціонування глутатіонової ланки АОС в тимоцитах і спленоцитах щурів за умов тривалої шлункової гіпоацидності можуть свідчити про негативний вплив наслідків цього патологічного стану на функціональну активність досліджуваних лімфоїдних клітин внаслідок розвитку окисно-відновного дисбалансу, викликаного надлишком утворення прооксидантів та зниженням АОЗ. Причому, більш виражене виснаження глутатіонової ланки АОЗ спостерігалось в лімфоцитах тимусу, що на фоні активації продукції ІФН (див. рис. 7.3.), який здатний викликати підвищення цитозольної концентрації іонів Ca^{2+} [285], посилення синтезу NO (див. рис. 7.7.), збільшення кількості ТБК-активних продуктів (див. рис. 7.9.) і зниження активності СОД (див. табл. 7.1.), може спричиняти активацію апоптичних процесів, порушення функціонального стану та диференціації досліджуваних клітин. На сьогодні значну увагу приділяють дослідженню безрецепторного шляху індукції апоптозу, який активується за умов зміщення балансу окисно-відновних процесів у клітині в бік інтенсифікації реакцій вільнорадикального переокислення та передує активації каспаз як основних виконавчих ензимів апоптозу. Вважається, що метаболічними ознаками активації цього шляху є падіння мітохондріального трансмембранного потенціалу, виснаження запасів GSH, посилена продукція АФК та підвищення концентрації цитозольного Ca^{2+} [335, 336].

В спленоцитах щурів з тривалою шлунковою гіпоацидністю підвищення активності ГП за умов зменшення вмісту GSH і КАТ та активації СОД може бути пов'язане з мобілізацією цього ферменту для знешкодження за участі GSH утвореного СОД перекису водню.

Зафіксований нами ефект виснаження АОС в тимоцитах і спленоцитах щурів може бути також пов'язаний з безпосереднім негативним впливом ОМ на ці клітини, що показано в інших дослідженнях наслідків дії ОМ та його аналогів на імунокомпетентні клітини [337, 338].

Введення мультипробіотика СИМ щурам з гіпоацидним станом у шлунку, нормалізувало досліджувані нами вміст GSH і активність глутатіонзалежних ферментів у тимоцитах і спленоцитах.

Отже, дисбаланс системи АОЗ в тимоцитах і спленоцитах щурів на фоні надлишкового утворення вільнорадикальних сполук може порушувати функціональну активність цих імунокомпетентних клітин та призводити до розвитку імунодефіцитного стану за умов дисбактеріозу та гіпергастринемії під час тривалого зниження шлункової секреції соляної кислоти. Мультипробіотик СИМ спричиняє імуномодулюючу дію на розвиток запальних процесів, яка супроводжується нормальним функціонуванням системи АОЗ в тимоцитах і спленоцитах щурів, за умов тривалої шлункової гіпоацидності.

Таким чином, оскільки зміни в імунній системі за умов розвитку запальних реакцій при різних захворюваннях можуть бути виявлені перед проявом їх клінічних ознак та здійснювати визначальний вплив на характер і перебіг патологічного процесу, подальше вивчення біохімічних механізмів пошкодження імунокомпетентних клітин і формування імунного дисбалансу за умов розвитку гіпергастринемії та порушень мікробіоценозу в травному тракті сприятиме впровадженню нових ефективних імунокорегуючих профілактичних та лікувальних заходів для подолання негативних наслідків тривалого гіпоацидного стану в шлунку. Дослідження нами впливу мультипробіотика СИМ на функціональний стан імунокомпетентних клітин тимуса та селезінки щурів за умов розвитку гіпергастринемії та дисбактеріозу в травному тракті на фоні тривалої шлункової гіпоацидності виявило імуномодулюючий ефект пробіотичних мікроорганізмів, який опосередкований стимуляцією проліферативних процесів, вираженими інтерферогенними властивостями, здатністю до регуляції активності NO-синтаз, нормалізуючим впливом на процеси ПОЛ і функціонування системи АОЗ у цих клітинах.

ЗАКЛЮЧЕННЯ

Дослідження молекулярно-біохімічних механізмів розвитку запалення є надзвичайно актуальним питанням, вирішення якого, безумовно, сприятиме попередженню та лікуванню багатьох захворювань. Існує багато підтверджень того, що хронічне запалення (як правило, інфекційної етіології) є фактором ризику розвитку, прогресування та метастазування пухлин [3, 12, 41, 339]. Проте останнім часом цей відомий факт викликав нову хвилю інтересу дослідників, що базується на сучасних уявленнях про взаємозв'язок і механізми запалення та канцерогенезу. На сьогодні запаленню відводять одну з ключових ролей у розвитку пухлин шлунково-кишкового тракту [4, 5]. Іншими факторами ризику канцерогенезу в травному тракті є гіпергастринемія та дисбактеріоз, які крім безпосереднього впливу на слизові оболонки, здатні викликати також розвиток запальних процесів [9, 340]. Основними причинами гіпергастринемії та порушення мікробіоценозу в шлунково-кишковому тракті є тривале пригнічення шлункової секреції соляної кислоти, яке також призводить до розвитку анемії, дефіциту вітаміну В12, заліза, кальцію [1].

Відомо, що застосування пробіотиків є одним з поширених, ефективних та безпечних методів усунення дисбіотичних та запальних процесів у травному тракті [341, 342, 343]. Однак, молекулярно-біохімічні механізми запалення та вплив на його перебіг пробіотиків за умов багатьох патологічних станів залишаються недостатньо з'ясованими.

Нами досліджено біохімічні механізми розвитку запалення в щурів з тривалою шлунковою гіпоацидністю та за умов введення мультипробіотика СИМ. Проведені дослідження дали змогу запропонувати можливий механізм порушення морфо-функціонального стану слизових оболонок шлунка та товстого кишечника в щурів за умов тривалого пригнічення шлункової секреції соляної кислоти. Тривалий гіпоацидний стан у шлунку викликали шляхом 28-добового введенням ОМ, який є блокатором протонної помпи – ферменту, який приймає участь у синтезі соляної кислоти парієтальними клітинами шлунка.

Показано, що тривала шлункова гіпоацидність спричиняє в слизових оболонках шлунка і товстого кишечника дисплазію та гіперплазію відповідно, а також негативні якісні та кількісні зміни мікробіоценозу з розвитком дисбалансу між показниками умовно-патогенної та нормальної мікрофлори. Зафіксовані морфологічні та дисбіотичні зміни в досліджуваних органах щурів з тривалою шлунковою гіпоацидністю не були виявлені при введенні експериментальним тваринам мультипробіотика СИМ, який містить 14 унікальних пробіотичних штамів біфідобактерій, лактобацил, лактококів, пропіоновокислих бактерій та фізіологічно корисних продуктів їх метаболізму. Крім того, 28-добове пригнічення шлункової секреції соляної кислоти, викликане введенням ОМ, призводило до зростання концентрації гастрину в сироватці крові щурів у 3 рази, порівняно з контролем. Окреме та поєднане з ОМ введення мультипробіотика СИМ не спричиняло достовірних змін концентрації гастрину в сироватці крові дослідних тварин.

Оскільки гіпергастринемія та дисбактеріоз можуть зумовлювати виникнення запальних процесів, а більшість пробіотиків – чинити протизапальну дію, нами було проведено вимірювання в сироватці крові модельних тварин концентрації основних прозапальних цитокінів: ІФН- γ , ФНП- α , ІЛ-1 β та ІЛ-6, які є важливими маркерами розвитку запалення. Виявлено, що введення СИМ інтактним щурам збільшувало концентрації ІФН- γ на 20 %, а ФНП- α , ІЛ-1 β , ІЛ-6 до 30 %, що може свідчити про здатність пробіотичних мікроорганізмів СИМ викликати імунну відповідь. За умов тривалого гіпоацидного стану спостерігалось збільшення в сироватці крові щурів концентрації ІФН- γ на 59 %, ФНП- α на 73 %, ІЛ-1 β на 80 % та достовірно не змінювалась концентрація ІЛ-6, порівняно з контролем. Виявлений нами ефект міг бути проявом активного розвитку запалення в щурів за умов гіпергастринемії та порушень мікробіоценозу на фоні тривалої шлункової гіпоацидності. При введенні мультипробіотика СИМ одночасно з ОМ в сироватці крові щурів концентрації ІФН- γ та ІЛ-6 залишались на рівні контролю, а концентрації ФНП- α та ІЛ-1 β були меншими на 15 і 20 %

відповідно, порівняно з групою щурів, яким вводили лише ОМ, та достовірно не відрізнялись від цих показників у щурів, яким вводили лише СИМ. Ці результати вказують на протизапальний вплив СИМ за умов гіпоацидного стану, що реалізується через зміну концентрації прозапальних цитокінів у сироватці крові, й можуть свідчити про імуномодулюючі властивості пробіотичних мікроорганізмів цього препарату або метаболітів, які утворюються в результаті їх життєдіяльності.

Оскільки на теперішній час доведена ключова роль NO в регуляції імунних реакцій та його участь практично на всіх етапах розвитку запалення [185], тому нами було досліджено вміст NO_2^- в сироватці крові щурів. За умов введення мультипробіотика СИМ інтактним щурам нами не було виявлено змін вмісту NO_2^- в сироватці крові порівняно з контролем. У сироватці крові щурів з тривалою шлунковою гіпоацидністю спостерігалось збільшення вмісту NO_2^- на 20 %. Це може свідчити про залучення NO до активації клітинно-опосередкованої імунної відповіді через його здатність в низьких концентраціях стимулювати клітинну ланку імунітету [194] та до розвитку запального процесу [186], які виникають внаслідок порушення мікробіоценозу в травному тракті. Крім того, невелике збільшення вмісту NO_2^- в сироватці крові може бути пов'язане з тим, що синтезований NO під час запалення здійснює свої біологічні функції безпосередньо в тканинах слизових оболонок травного тракту, де може викликати ушкодження клітинних структур [203].

Відомо, що система NO регулює залежні від кисню процеси, зокрема функціонування системи АОЗ та процеси ПОЛ [204].

В результаті дослідження вмісту ТБК-АП у сироватці крові щурів нами було встановлено зниження їх рівня на 50 % за умов введення мультипробіотика СИМ, що може свідчити про здатність пробіотичних мікроорганізмів СИМ пригнічувати процеси ПОЛ. Введення СИМ інтактним щурам також не впливало на вміст ВГ та активність СОД і ГР, призводило до незначного збільшення активності КАТ і ГП та зменшення активності ГТ в сироватці крові. Встановлений нами ефект узгоджується з результатами

досліджень, в яких була показана здатність молочнокислих бактерій пригнічувати процеси ПОЛ, захоплювати вільні радикали, активувати систему АОЗ [211]. Тривала шлункова гіпоацидність призводила в сироватці крові до значного зростання вмісту ТБК-АП та зміни функціонування в системі АОЗ: знижувались активність СОД, ГР та рівень ВГ, зростали активності КАТ, ГП і ГТ, що може бути проявом порушення процесів ПОЛ та дисбалансу в системі АОЗ. Введення мультипробіотика СИМ одночасно з ОМ приводило до нормалізації вмісту ТБК-АП і ВГ та активності ГР і ГП, зростання активності СОД та зменшення активності КАТ і ГТ порівняно з групою щурів, яким вводили лише ОМ, що свідчило про посилення антиоксидантних властивостей сироватки крові у щурів з тривалою шлунковою гіпоацидністю.

Відомо, що NO не лише відіграє ключову роль в імунних реакціях та під час запалення, але й може брати участь у захисті та пошкодженні слизових оболонок травного тракту [199], а також здатний пригнічувати секрецію соляної кислоти в шлунку [255] та стимулювати синтез гастрину [79]. Тому нами було досліджено активність NOS і вміст NO_2^- у слизових оболонках шлунка та товстого кишечника. Введення СИМ інтактним щурам спричиняло зростання в слизових оболонках шлунка і товстого кишечника активності NOS та вмісту NO_2^- , порівняно з інтактними тваринами, що, ймовірно, пов'язане з імунomodуючими властивостями СИМ та активацією імунної відповіді за участі NO. Високий рівень NO_2^- у товстому кишечнику міг бути зумовлений здатністю пробіотичних мікроорганізмів СИМ генерувати NO, що корелює з іншими дослідженнями, в яких показана здатність пробіотиків синтезувати NO [263]. Пригнічення шлункового кислотоутворення призводило до значного зростання в шлунку та товстому кишечнику відповідно активності NOS на 148 і 115 % та вмісту NO_2^- на 150 і 158 %, порівняно з контролем. Таке різке зростання активності NOS і вмісту NO_2^- у шлунку та товстому кишечнику може вказувати на активацію iNOS внаслідок розвитку дисбактеріозу, гіпергастринемії та запалення в цих органах, які розвиваються на фоні гіпоацидного стану. Введення щурам СИМ за умов тривалої шлункової

гіпоацидності призводило до зменшення в шлунку та товстому кишечнику активності NOS та вмісту NO_2^- , порівняно з групою тварин, яким вводили лише ОМ, але ці показники залишались вищими, ніж у контролі та в групі щурів, яким вводили лише СИМ. Зафіксований ефект може бути пов'язаний зі зниженням концентрації прозапальних цитокінів в сироватці крові даної групи тварин, які є сильними індукторами iNOS.

Отже, NO, що утворювався внаслідок активації NOS, за умов 28-добової шлункової гіпоацидності може активно залучатись до процесів розвитку запалення та пошкодження слизових оболонок шлунка та товстого кишечника.

Баланс між фізіологічними, регуляторними та/або цитотоксичними властивостями NO в значній мірі зумовлений його локальною концентрацією, а також прооксидантно-антиоксидантним статусом тканин, в яких він синтезується та реалізує свої ефекти [187]. Тому наступним етапом наших досліджень було визначення продуктів ПОЛ і стану антиоксидантної системи в слизових оболонках шлунка та товстого кишечника.

Нами виявлено зростання вмісту ТБК-АП в слизових оболонках шлунка і товстого кишечника щурів за умов тривалої шлункової гіпоацидності в 4,6 та 1,6 рази відповідно порівняно з контролем. Це може свідчити про надмірну активацію процесів ПОЛ внаслідок порушення прооксидантно-антиоксидантної рівноваги, та можливий пошкоджуючий вплив їх продуктів на слизові оболонки досліджуваних органів за умов розвитку запалення. Введення СИМ щурам з тривалим гіпоацидним станом спричиняло зменшення вмісту ТБК-АП в слизових оболонках шлунка і товстого кишечника відповідно в 2,9 рази та на 18 % порівняно з щурами, яким вводили лише ОМ. Отримані результати вказують на послаблення інтенсивності процесів ПОЛ.

Зростання вмісту продуктів ПОЛ може бути наслідком низької активності антиоксидантних ферментів, тому нами було досліджено вміст ВГ та активність основних антиоксидантних ензимів в слизових оболонках шлунка та товстого кишечника. Показано, що введення СИМ інтактним щурам не викликало змін активності ферментів АОЗ в досліджуваних органах, тоді як вміст ВГ

збільшувався на 22 % в слизовій оболонці товстого кишечника. Тривале пригнічення шлункової секреції соляної кислоти ОМ призводило до зростання в шлунку активності СОД в 5,5 раза і КАТ на 26 % та до зменшення активності цих ферментів на 36 % і 46 % в товстому кишечнику відповідно порівняно з контролем. Вміст ВГ і активність глутатіонзалежних ферментів у даній групі тварин знижувались в обох досліджуваних органах. На фоні збільшення вмісту ТБК-АП і зростання продукції NO це може свідчити про розвиток оксидативного/нітрозативного стресу, який зумовлений дисбалансом у функціонуванні системи та виснаженням ферментів АОЗ в шлунку та товстому кишечнику за умов запалення під час зниженої шлункової кислотності. Виявлено, що за умов тривалої шлункової гіпоацидності введення СИМ позитивно впливало на активність досліджуваних ферментів АОЗ в слизових оболонках шлунка і товстого кишечника.

Загальновідомо, що розвиток запалення залежить від функціонування імунної системи. З огляду на це нами було досліджено цитоморфологічну реакцію тимуса і селезінки щурів за умов тривалої шлункової гіпоацидності та введення СИМ. Введення СИМ інтактним щурам не викликало змін відносної ваги тимуса і селезінки, але спричиняло зростання відносної клітинності в цих органах, що може вказувати на здатність СИМ викликати реакцію імунної системи. Тривала шлункова гіпоацидність призводила до гомеостатичних перебудов в досліджуваних лімфоїдних органах щурів, про що свідчили зниження відносної ваги та збільшення відносної клітинності тимуса та збільшення обох показників у селезінці. Виявлені зміни могли бути пов'язані, як з розвитком запалення та дисбактеріозу, так і з розвитком анемії та впливом ОМ. Введення СИМ разом з ОМ збільшувало відносні вагу та клітинність тимуса та селезінки щурів, що може вказувати на активацію в них проліферативних процесів, з імовірним, залученням лімфоїдних клітин цих органів до розвитку запалення та подолання негативних наслідків тривалого гіпоацидного стану.

Зміни функціонального стану імунокомпетентних клітин супроводжують розвиток багатьох патологічних процесів у організмі [169]. Відомо, що ІФН виконують цілий ряд біологічних функцій [292], зокрема регулюють імунну відповідь, виконуючи роль одного з перших сигналів при активації лімфоцитів [294]. Нами було показано, що окреме та поєднане введення СИМ і ОМ призводило до зростання спонтанної та індукованої ФГА і ЦФН продукції ІФН тимоцитами та спленоцитами щурів. Це вказує на достатньо велику резервну здатність цих клітин до синтезу ІФН, а також на активне залучення інтерференової ланки до механізмів розвитку запалення та імуномодулюючої дії СИМ за умов тривалої шлункової гіпоацидності. Ведення СИМ викликало більш виражений стимулюючий вплив на синтез ендогенного та ФГА-індукованого ІФН в тимоцитах щурів, ніж введення ОМ, що на фоні збільшення концентрації ІФН- γ в сироватці крові може свідчити про його потужні інтерференогенні властивості.

Одним з ключових ферментів системи інтерферону є 2',5'-ОАС, яка стимулюється при дії інтерферону і синтезує вторинні посередники - 2',5'-олігоаденілати [344] та бере участь у контролі онкогенної стабільності, регуляції процесів проліферації, диференціації, апоптозу тощо [302, 345]. Нами було визначено активність 2',5'-ОАС в лімфоїдних клітинах тимуса та селезінки щурів, в тому числі за умов їх преінкубації з індукторами ІФН: ФГА та ЦФН. Виявлено, що преінкубація тимоцитів і спленоцитів щурів усіх груп *in vitro* з індукторами ІФН викликала зростання активності 2',5'-ОАС порівняно з клітинами, які не оброблялися індукторами. Окреме введення СИМ інтактним щурам не спричиняло змін активності 2',5'-ОАС в тимоцитах і спленоцитах, зокрема й за умов преінкубації *in vitro* цих клітин з індукторами ІФН. Показано, що за умов тривалої шлункової гіпоацидності в тимоцитах і спленоцитах знижується активність 2',5'-ОАС, а також здатність до стимуляції цього ферменту при дії індукторів ІФН *in vitro* в тимоцитах порівняно з контролем. Отриманий ефект може бути зумовлений пригніченням процесів трансдукції сигналу в ІФН-індукованій системі 2',5'-олігоаденілату, як внаслідок токсичної

дії ОМ, який, як показано [304], може пригнічувати функції імунних клітин, так і внаслідок впливу вільних радикалів, які можуть накопичуватись під час виникнення в імунних клітинах оксидативного стресу. Введення СИМ за умов тривалої гіпоацидності шлункового соку не змінювало рівень активності 2',5'-ОАС в тимоцитах і спленоцитах, в тому числі й при попередній інкубації цих клітин з індукторами ІФН, порівняно з групою щурів, яким вводили лише ОМ. Це може свідчити про відсутність впливу СИМ на активність 2',5'-ОАС в імунокомпетентних клітинах тимуса та селезінки, не зважаючи на виражені інтерферогенні властивості цього препарату.

Відомо, що NO синтезується багатьма імунокомпетентними клітинами та є універсальним медіатором в імунній системі [188]. NO бере участь у протиінфекційному захисті та регуляції механізмів розвитку гуморальної та клітинної імунної відповіді [313]. Крім того, NO є важливим регулятором функцій Т-клітин [319], а також активно бере участь у процесах проліферації, диференціації, апоптозу імунокомпетентних клітин, взаємодії між імунними та іншими клітинами [318]. Залежно від типу та фази запальної реакції NO може відігравати роль як проти-, так і прозапального фактора [315]. Нами показано, що за умов окремого введення СИМ щурам в тимоцитах незначно зростає вміст NO_2^- , а в спленоцитах – рівень активності NOS, порівняно з контролем. Тривале зниження шлункової секреції соляної кислоти призводило до зростання в тимоцитах і спленоцитах відповідно активності NOS на 50 і 75 % та вмісту NO_2^- на 53 і 58 % порівняно з контролем. Введення СИМ щурам разом з ОМ також призводило до підвищення, порівняно з контролем, відповідно в тимоцитах і спленоцитах активності NOS на 25 і 41 % та вмісту NO_2^- на 29 і 25%, але порівняно з групою тварин з гіпоацидним станом ці показники були нижчими приблизно на 20 % та не відрізнялись від показників групи щурів, яким вводили лише СИМ. Отже, NO, що продукується тимоцитами та спленоцитами щурів за умов тривалої шлункової гіпоацидності та введення СИМ, може брати активну участь у нітрооксидзалежних механізмах протиінфекційної резистентності,

регуляції імунних реакцій та реалізації NO-залежних ефектів у імунокомпетентних клітинах.

Формування імунної відповіді та функціональний стан імунокомпетентних клітин залежать від протікання в них вільнорадикальних реакцій і стану антиоксидантної системи. Показано участь вільнорадикальних продуктів у активації, проліферації, диференціації, реалізації функцій імунних клітин [331]. Нашими дослідженнями вмісту ТБК-АП, ВГ та активності ферментів АОЗ в тимоцитах і спленоцитах щурів за умов тривалої шлункової гіпоацидності виявлено розвиток окисно-відновного дисбалансу, викликаний надлишковою активацією процесів ПОЛ, порушенням функціонування та виснаженням ферментативної ланки АОЗ, що може негативно впливати на функціональну активність досліджуваних лімфоїдних клітин. Поєднане введення щурам з ОМ мультипробіотика СИМ приводило до нормалізації процесів ПОЛ та функціонування ферментів АОЗ в тимоцитах і спленоцитах, що позитивно впливало на їх функціональний стан.

Таким чином, морфо-функціональні зміни у слизових оболонках шлунка і товстого кишечника щурів за умов тривалої шлункової гіпоацидності можуть бути зумовлені розвитком гіпергастринемії та дисбактеріозу, та викликаних ними запаленням і оксидативним/нітрозативним стресом у досліджуваних органах. Виявлено, що мультипробіотик «Симбітер®» спричиняє захисний вплив у слизових оболонках шлунка та товстого кишечника, володіє протизапальними, інтерференогенними, імуномодулюючими властивостями та здатен позитивно впливати на процеси перекисного окислення ліпідів і функціонування системи антиоксидантного захисту, в тому числі за умов гіпергастринемії та дисбактеріозу на фоні тривалої шлункової гіпоацидності.

Отже, з'ясування механізмів модулюючої дії мультипробіотика «Симбітер®» сприятиме його подальшому впровадженню в якості додаткового ефективного методу лікування кислотоасоційованих захворювань з метою подолання та профілактики негативних наслідків тривалої шлункової гіпоацидності.

ВИСНОВКИ

1. Досліджено вплив мультипробіотика «Симбітер®» на біохімічні механізми розвитку запалення в щурів за умов тривалої шлункової гіпоацидності. Показано, що до розвитку запалення в щурів за умов досліджуваної патології активно залучені прозапальні цитокіни, система інтерферону, оксид азоту, процеси перекисного окислення ліпідів і антиоксидантна система. Мультипробіотик «Симбітер®» виявив протизапальні, інтерфероногенні, імуномодулюючі властивості а також здатність впливати на процеси перекисного окислення ліпідів і систему антиоксидантного захисту.

2. Тривала шлункова гіпоацидність призводила до розвитку гіпергастринемії, порушення мікробіоценозу та морфологічних змін в слизових оболонках шлунка та товстого кишечника щурів, які корегувались за умов введення мультипробіотика «Симбітер®».

3. Показано збільшення концентрації прозапальних цитокінів: інтерферону- γ , фактору некрозу пухлин- α , інтерлейкіну- 1β , інтерлейкіну-6 в сироватці крові щурів за умов тривалої шлункової гіпоацидності та модулюючий вплив на неї мультипробіотика «Симбітер®».

4. Встановлено зростання активності синтази оксиду азоту та вмісту нітрит-іонів в слизових оболонках шлунка та товстого кишечника, тимоцитах і спленоцитах щурів з тривалою шлунковою гіпоацидністю та за умов введення мультипробіотика «Симбітер®».

5. Виявлено посилення процесів перекисного окислення ліпідів в сироватці крові, слизових оболонках шлунка та товстого кишечника, тимоцитах і спленоцитах щурів з тривалим гіпоацидним станом та їх зменшення за умов введення мультипробіотика «Симбітер®».

6. Показано, що за умов тривалої шлункової гіпоацидності в сироватці крові, тимоцитах, спленоцитах, слизових оболонках шлунка та товстого кишечника щурів спостерігаються дисбаланс та виснаження в системі антиоксидантного захисту, які відсутні під час введення мультипробіотика «Симбітер®».

7. Зафіксовано гомеостатичні перебудови в тимусі та селезінці щурів з тривалою гіпоацидністю шлункового соку та за умов введення мультипробіотика «Симбітер®».

8. Тривала шлункова гіпоацидність та введення мультипробіотика «Симбітер®» призводили до посилення продукції інтерферону тимоцитами і спленоцитами щурів. За умов введення омепразолу спостерігалось зниження активності 2',5'-олігоаденілатсинтетази в тимоцитах і спленоцитах щурів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Ali T. Long-term Safety Concerns with Proton Pump Inhibitors / T. Ali, D. N. Roberts, W. M. Tierney // *The American Journal of Medicine*. – 2009. – Vol. 122, № 10. – P. 896-903.
2. Кулинский В. И. Биохимические аспекты воспаления / В. И. Кулинский // *Биохимия*. – 2007. – Т. 72, № 6. – С. 733-746.
3. Sgambato A. Inflammation and cancer: a multifaceted link / A. Sgambato, A. Cittadini // *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci*. – 2010. – Vol. 14, № 4. – P. 263-268.
4. Fox J.G. Inflammation, atrophy, and gastric cancer / J. G. Fox, T. C. Wang // *The Journal of Clinical Investigation*. – 2007. – Vol. 117, № 1. – P. 60-69.
5. Inflammation and colon cancer / J. Terzić, S. Grivennikov, E. Karin [et al.] // *Gastroenterology*. – 2010. - Vol. 138, № 6. – P.2101-2114.
6. Chronic inflammation and oxidative stress in human carcinogenesis/ A. Federico, F. Morgillo, C. Tuccillo [et al.] // *Int. J. Cancer*. – 2007. – Vol. 121. – P. 2381-2386.
7. Mantovani A. Molecular pathways linking inflammation and cancer / A. Mantovani // *Curr. Mol. Med*. – 2010. – Vol. 10. – P. 369-373.
8. Grivennikov S. I. Immunity, Inflammation and Cancer / S. I. Grivennikov, F. R. Greten, M. Karin // *Cell*. – 2010. – Vol. 140, № 6. – P. 883-899.
9. Burkitt M. D. Importance of gastrin in the pathogenesis and treatment of gastric tumors / M. D. Burkitt, A. Varro, D. M. Pritchard // *World J Gastroenterol*. – 2009. – Vol. 15. – P. 1–16.
10. Friis-Hansen L. Achlorhydria is associated with gastric microbial overgrowth and development of cancer: Lessons learned from the gastrin knockout mouse / L. Friis-Hansen // *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*. – 2006. – Vol. 66, № 7. – P. 607-622.
11. Aggarwal B. B. Targeting inflammatory pathways for prevention and therapy of cancer: short-term friend, long-term foe / B. B. Aggarwal, R. V. Vijayalekshmi, B. Sung // *Clin. Cancer Res*. – 2009. – Vol. 15. – P. 425-430.

12. Kuper H. Infections as a major preventable cause of human cancer / H. Kuper, H. O. Adami, D. Trichopoulos // *Journal of Internal Medicine*. – 2001. – Vol. 249, № 741, P. 61–74.
13. Huycke M. M. Commensal Bacteria, Redox Stress, and Colorectal Cancer: Mechanisms and Models / M. M. Huycke, H. R. Gaskins // *Experimental Biology and Medicine*. – 2004. – Vol. 229, № 7. – P. 586-597.
14. Alvarez-Olmos M. I. Probiotics agents and infectious diseases: a modern perspective on a traditional therapy / M. I. Alvarez-Olmos, A. Oberhelman // *Clin. Infect. Dis.* – 2001. – Vol. 32. – P. 1567–1576.
15. Янковский Д. С. Микрофлора и здоровье человека / Д. С. Янковский, Г. С. Дымент– К.: «Червона Рута-Турс». – 2008. – 552 с.
16. Peterson M. Probiotics / M. Peterson // *Bioceuticals*. – 2002. – Vol.23. – P. 565-573.
17. Gupta V. Probiotics / V. Gupta, R. Garg // *Indian. J. Med. Microbiol.* – 2009. – Vol. 27. – P. 202-209.
18. Allsopp P. Potential Protective Effects of Probiotics and Prebiotics Against Colorectal Cancer / P. Allsopp, I. Rowland // *Prebiotics and Probiotics Science and Technology*. – 2009. – Vol. 26. – P. 997-1048.
19. Denipote F. G. Probiotics and prebiotics in primary care for colon cancer / F. G. Denipote, E. B. Trindade, R.C. Burini // *Arq Gastroenterol.* – 2010. – Vol. 41, № 1. – P. 93-98.
20. The inflammatory micro environment in tumor progression: The role of tumor-associated macrophages / P. Allavena, A. Sica, G. Solinas [et al.] // *Crit Rev Oncol Hematol*. – 2008. – Vol. 66, № 1. – P. 1-9.
21. Кулинский В. И. Биохимические аспекты воспаления (обзор) / В. И. Кулинский // *Биохимия*. – 2007. – № 1. – С. 95-101.
22. Haddad J. J. Cytokines and related receptor-mediated signaling pathways / J. J. Haddad // *Biochem Biophys Res Commun*. – 2002. – Vol. 297, № 4. – P. 700-713.

23. Cytokine receptors and signal transduction / A. Miyajima, T. Kitamura, N. Harada [et al.] // *Annu Rev Immunol.* – 1992. – Vol. 10. – P. 295-331.

24. Dalgleish A. G. Chronic immune activation and inflammation in the pathogenesis of AIDS and cancer / A. G. Dalgleish, K. J. O'Byrne // *Adv. Cancer Res.* – 2002. – Vol. 84. – P. 231–276.

25. Hold G. L. Genetic aspects of inflammation and cancer / G. L. Hold, M. E. El-Omar // *Biochem J.* – 2008. – Vol. 410, № 2. – P. 225-235.

26. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease / M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol [et al.] // *Int J Biochem Cell Biol.* – 2007. – Vol. 39, № 1. – P. 44-84.

27. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer / M. Valko, C. J. Rhodes, J. Moncol [et al.] // *Chem Biol Interact* 2006. – Vol. 160, № 1. – P. 1-40.

28. Wickens A. P. Ageing and the free radical theory / A. P. Wickens // *Respir Physiol.* – 2001. – Vol. 128, № 3. – P. 379-391.

29. Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life / M. Inoue, E. F. Sato, M. Nishikawa [et al.] // *Curr Med Chem.* – 2003. – Vol. 10, № 23. – P. 2495-2505.

30. Conner E. M. Inflammation, free radicals, and antioxidants / E. M. Conner, M. B. Grisham // *Nutrition.* – 1996. – Vol. 12, № 4. – P. 274-277.

31. Klaunig J. E. The role of oxidative stress in carcinogenesis / J. E. Klaunig, L. M. Kamendulis // *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* – 2004. – Vol. 44. – P. 239-267.

32. Segal W. How superoxide production by neutrophil leukocytes kill microbes / W. Segal // *Novartis Found Symp.* – 2006. – Vol. 279. – P. 92-98.

33. Flalkow L. Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function / L. Flalkow, Y. Wang, G. P. Downey // *Free Radic Biol Med.* – 2007. – Vol. 42. – P. 153-164.

34. Karin M. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression / M. Karin // *Nature.* – 2006. – Vol. 441. – P. 431-436.

35. Lippman RD. Lipid peroxidation and metabolism in aging / R. D. Lippman. – In: Rothstein, M. Ed Review of Biological Research in Aging, Alan R. Liss, New York 1983. – Vol. 1. – P. 315-342.
36. Glutathione peroxidase 4 protects cortical neurons from oxidative injury and amyloid toxicity / O. Ran, M. Gu, H. Van Remmen [et al.] // J Neurosci Res. – 2006. – Vol. 84. – P. 202-208.
37. Ames B. N. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging / B. N. Ames, M. K. Shigenaga, T. M. Hagen // Proc Natl Acad Sci USA. – 1993. – Vol. 90, № 17. – P. 7915-7922.
38. Analysis of glutathione: Implication in redox and detoxification / A. Pastoret, G. Federici, E. Bertini [et al.] // Clin Chim Acta. – 2003. – Vol. 333. – P. 19-39.
39. Role of inflammation in chemical-induced lung cancer / A. Emmendoerffer, M. Hecht, T. Boeker [et al.] // Toxicol Lett. – 2000. – Vol. 112-113. – P. 185-191.
40. Costa A. D. Intramitochondrial signaling: interactions among mitoKATP, PKC epsilon, ROS and MPT / A. D. Costa, K. D. Garlid // Am J Physiol Heart Circ Physiol. – 2007. – Vol. 294. – P. 874-882.
41. Coussens L. M. Inflammation and cancer / L. M. Coussens, Z. Werb // Nature. – 2002. – Vol. 420. – P. 860-867.
42. Azad N. Inflammation and lung cancer: roles of reactive oxygen/nitrogen species / N. Azad, Y. Rojanasakul, V. Vallyathan // J Toxicol Environ Health B Crit Rev. – 2008. – Vol. 11, № 1. – P. 1-15.
43. Nathan C. Points of control in inflammation / C. Nathan // Nature. – 2002. – Vol. 420. – P. 846-852.
44. Hinson R. M. Elevated interleukin 6 is induced by prostaglandin E2 in a murine model of inflammation: Possible role of cyclooxygenase-2 / R. M. Hinson, J. A. Williams, E. Shacter // Proc Natl Acad Sci USA. – 1996. – Vol. 93. – P. 4885-4890.

45. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? / S. Reuter, S. C. Gupta, M. M. Chaturvedi [et al.] // *Free Radic Biol Med.* – 2010. – Vol. 49, № 11. – P. 1603-16.
46. Hanahan D. The hallmarks of cancer / D. Hanahan, R. A. Weinberg // *Cell.* – 2000. – Vol. 100. – P. 57-70.
47. Kraus S. Inflammation and colorectal cancer / S. Kraus, N. Arber // *Curr. Opin. Pharmacol.* – 2009. – Vol. 9. – P. 405-410.
48. Hussain S. P. Radical causes of cancer / S. P. Hussain, L. J. Hofseth, C. C. Harris // *Nat. Rev. Cancer.* – 2003. – Vol. 3. – P. 276-285.
49. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic Instability / F. Colotta, P. Allavena, A. Sica [et al.] // *Carcinogenesis.* – 2009. – Vol. 30. – P. 1073-1081.
50. Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment / H. Yu [et al.] // *Nat. Rev. Immunol.* – 2007. – Vol. 7. – P. 41-51.
51. Persistently activated Stat3 maintains constitutive NFkappaB activity in tumors / H. Lee [et al.] // *Cancer Cell.* – 2009. – Vol. 15. – P. 283-293.
52. Hepatocyte necrosis induced by oxidative stress and IL-1 alpha release mediate carcinogen-induced compensatory proliferation and liver tumorigenesis / T. Sakurai, G. He, A. Matsuzawa [et al.] // *Cancer Cell.* – 2008. – Vol. 14. – P. 156-165.
53. IKKbeta couples hepatocyte death to cytokine-driven compensatory proliferation that promotes chemical hepatocarcinogenesis / S. Maeda, H. Kamata, J. L. Luo [et al.] // *Cell.* – 2005. – Vol. 121. – P. 977-990.
54. Lewis C. E. and Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments / C. E. Lewis, J. W. Pollard // *Cancer Res.* – 2006. – Vol. 66. – P. 605-612.
55. Grivennikov S. I. Dangerous liasons: STAT3 and NFkappaB collaboration and crosstalk in cancer / S. I. Grivennikov, M. Karin // *Cytokine Growth Factor Rev.* – 2010. – Vol. 1. – P. 11-19.

56. Yu H. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3 / H. Yu, D. Pardoll, R. Jove // *Nat. Rev. Cancer.* – 2009. – Vol. 9. – P. 798-809.

57. The JAK2 inhibitor AZD1480 potently blocks Stat3 signaling and oncogenesis in solid tumors / M. Hedvat, D. Huszar, A. Herrmann [et al.] // *Cancer Cell.* – 2009. – Vol. 16. – P. 487-497.

58. TGF-beta suppresses tumor progression in colon cancer by inhibition of IL-6 trans-signaling / C. Becker, M.C. Fantini, C. Schramm [et al.] // *Immunity.* – 2004. – Vol. 21. – P. 491-501.

59. Gp130-mediated Stat3 activation in enterocytes regulates cell survival and cell-cycle progression during colitis-associated tumorigenesis / J. Bollrath, T. J. Phesse, V. A. von Burstin [et al.] // *Cancer Cell.* – 2009. – Vol. 15. – P. 91-102.

60. Kalluri R. The basics of epithelial-mesenchymal transition / R. Kalluri, R. A. Weinberg // *J. Clin. Invest.* – 2009. – Vol. 119. – P. 1420-1428.

61. Joyce J. A. Microenvironmental regulation of metastasis / J. A. Joyce, J. W. Pollard // *Nat. Rev. Cancer.* – 2009. – Vol. 9. – P. 239-252.

62. Polyak K. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits / K. Polyak, R. A. Weinberg // *Nat. Rev. Cancer.* – 2009. – Vol. 9. – P. 265-273.

63. Carcinoma-produced factors activate myeloid cells through TLR2 to stimulate metastasis / S. Kim, H. Takahashi, W. W. Lin [et al.] // *Nature.* – 2009. – Vol. 457. – P. 102-106.

64. Yang J. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis / J. Yang, R. A. Weinberg // *Dev. Cell.* – 2008. – Vol. 14. – P. 818-829.

65. De Martel C. Infections and cancer: established associations and new hypotheses / C. De Martel, S. Franceschi // *Crit Rev Oncol Hematol.* – 2009. – Vol. 70. – P. 183-194.

66. Gastritis and hypergastrinemia due to *Acinobacter lwofii* in mice / Y. Zavros, G. Rieder, A. Ferguson [et al.] // *Infect Immun.* – 2002. – Vol. 70. – P. 2630-2639.

67. Genetic and chemical hypochlorhydria is associated with inflammation that modulates parietal and G-cell populations in mice / Y. Zavros, G. Rieder, A. Ferguson [et al.] // *Gastroenterology.* – 2002. – Vol. 122, № 1. – P. 119-133.

68. Gastrin induces leucocyte-endothelial cell interactions in vivo and contributes to the inflammation caused by *Helicobacter pylori* / A. Alvarez, S. Ibiza, C. Hernandez [et al.] // *FASEB J.* – 2006. – Vol. 20. – P. 2396-2398.

69. The gastrins: their production and biological activities / G. Dockray, A. Varro, R. Dimaline [et al.] // *Annu. Rev. Physiol.* – 2001. – Vol. 63. – P. 119-139.

70. Cellular expression of CCK-A and CCK-B/gastrin receptors in human gastric mucosa / F. Schmitz, M. Goke, J. Otte [et al.] // *Regul. Pept.* – 2001. – Vol. 102. – P. 101-110.

71. Akdis C. A. Histamine receptors are hot in immunopharmacology / C. A. Akdis, F. E. Simons // *Eur. J. Pharmacol.* – 2006. – Vol. 533. – P. 69-76.

72. Zhang M. The histamine H(4) receptor: a novel modulator of inflammatory and immune disorders / M. Zhang, R. L. Thurmond, P. J. Dunford // *Pharmacol. Ther.* – 2007. – Vol. 113. – P. 594-606.

73. Characterization of gastrin-induced proangiogenic effects in vivo in orthotopic U373 experimental human glioblastomas and in vitro in human umbilical vein endothelial cells / F. Lefranc, T. Mijatovic, V. Mathieu [et al.] // *Clin Cancer Res.* – 2004. – Vol. 10. – P. 8250-8265.

74. Gastrin enhances the angiogenic potential of endothelial cells via modulation of heparinbinding epidermal-like growth factor / P. A. Clarke, J. H. Dickson, J. C. Harris [et al.] // *Cancer Res.* – 2006. – Vol. 66. – P. 3504-3512.

75. Gastric antisecretory drugs induce leukocyte-endothelial cell interactions through gastrin release and activation of CCK-2 receptors / A. Alvarez, M. S. Ibiza, M. M. Andrade [et al.] // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2007. – Vol. 323. – P. 406-413.

76. Identification of CCK-B/gastrin receptor splice variants in human peripheral blood mononuclear cells / F. Schmitz, H. Schrader, J. Otte [et al.] // *Regul. Pept.* – 2001. – Vol. 101. – P. 25-33.

77. Tumour necrosis factor alpha antibody affects gastrin release in Crohn disease / W. P. Hopman, D. J. de Jong, A. H. Naber [et al.] // *Scand J Gastroenterol.* – 2003. – Vol. 38, № 5. – P. 522-525.

78. Gastrin secretion from primary cultures of rabbit antral G cells: stimulation by inflammatory cytokines / N. Weigert, K. Schaffer, V. Schusdziarra [et al.] // *Gastroenterology.* – 1996. – Vol.110, №1. – P.147-154.

79. Chronic gastritis with expression of inducible nitric oxide synthase is associated with high expression of interleukin-6 and hypergastrinaemia / H. Kai, M. Ito, Y. Kitadai [et al.] // *Alimentary Pharmacology & Therapeutics.* – 2004. – Vol.19, № 12. – P.1309-1314.

80. Probiotics and immunity / A. T. Borhers, C. Selmi, F. J. Meyers [et al.] // *J. Gastroenterology.* – 2009. – Vol. 44. – P. 26-46.

81. Бондаренко В. М. Взаимодействие кишечной микрофлоры с Toll-подобными рецепторами / В. М. Бондаренко, В. Г. Лиходед // *Иммунология.* – 2009. – № 5. – С. 317-320.

82. Rhee K. J. Role of commensal bacteria in development of gut-associated lymphoid tissues and preimmune antibody repertoire / K. J. Rhee, P. Sethupathi, A. Driks // *J. Immunol.* – 2004. – Vol. – 172. – P. 1118-1124.

83. Microbial-gut interactions in health and disease / K. M. Pickard, A. N. Bremner, J. N. Gordon [et al.] // *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* – 2004. – Vol. 18. – P. 271-285.

84. Blandino G. Probiotics: overview of microbiological and immunological characteristics / G. Blandino, D. Fazio, R. Marco // *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* – 2008. – Vol. 6. – P. 497-508.

85. Хаитов Р. М. Роль паттернраспознающих рецепторов во врожденном и адаптивном иммунитете / Р. М. Хаитов, М. В. Пащенко, Б. В. Пинегин // *Иммунология.* – 2009. – № 1. – С. 66-76.

86. Underhill D. M. Toll-like receptors: key mediators of microbe detection / D. M. Underhill, A. Ozinsky // *Curr. Opin. Immunol.* – 2002. – Vol. 14. – P. 103-110.
87. Маянский А. Н. Нуклеарный фактор κВ и воспаление / А. Н. Маянский, Н. А. Маянский, М. И. Заславская // *Цитокины и воспаление.* – 2007. – Т. 6, № 2. – С. 3-9.
88. Tak P. P. NF- κB: a key role in inflammatory diseases / P. P. Tak, G. S. Firestein // *J.Clin. Invest.* – 2001. – Vol. 107. – P. 7-11.
89. Abrea M. T. TLR signaling in the gut in health and disease / M. T. Abrea, M. Fukata, M. Arditi // *J. Immunol.* – 2005. – Vol. 174. – P. 4453-4460.
90. Бондаренко В. М. Молекулярно-клеточные механизмы терапевтического действия пробиотических препаратов / В. М. Бондаренко // *Фарматека.* – 2010. – № 2. – С.26-32.
91. Mechanisms of action of probiotics: recent advances / S. C. Ng, A. L. Hart, M. A. Kamm [et al.] // *Inflamm Bowel Dis.* – 2009. – Vol. 15, №2. – P. 300-310.
92. Antimicrobial activity of lacticin 3,147 against clinical *Clostridium difficile* strains / M. C. Rea, E. Clayton, P. M. O'Connor [et al.] // *J Med Microbiol.* – 2007. – Vol. 56. – P. 940-946.
93. Gotteland M. Systematic review: are probiotics useful in controlling gastric colonization by *Helicobacter pylori*? / M. Gotteland, O. Brunser, S. Cruchet // *Aliment Pharmacol Ther.* – 2006. – Vol. 23. – P. 1077-1086.
94. Induction of human beta-defensin 2 by the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is mediated through agellin / M. Schlee, J. Wehkamp, A. Altenhoefer [et al.] // *Infect Immun.* – 2007. – Vol. 75. – P. 2399-2407.
95. Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function / K. Madsen, A. Cornish, P. Soper [et al.] // *Gastroenterology.* – 2001. – Vol. 121. – P. 580-591.
96. Otte J. M. Functional modulation of enterocytes by Gram-positive and Gram-negative microorganisms / J. M. Otte, D. K. Podolsky // *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* – 2004. – Vol. 286. – P. G613-G626.

97. Yan F. Probiotic bacterium prevents cytokine-induced apoptosis in intestinal epithelial cells / F. Yan, D. B. Polk // *J Biol Chem.* – 2002. – Vol. 277. – P. 50959-50965.

98. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis / S. Rakoff-Nahoum, J. Paglino, F. Eslami-Varzaneh [et al.] // *Cell.* – 2004. – Vol. 118. – P. 229-241.

99. Prokaryotic regulation of epithelial responses by inhibition of I κ B- α ubiquitination / A. S. Neish, A. T. Gewirtz, H. Zeng [et al.] // *Science.* – 2000. – Vol. 289. – P. 1560-1563.

100. Андреева И. В. Потенциальные возможности применения пробиотиков в клинической практике / И. В. Андреева // *Клин. микробиол. антимикроб. химиотер.* – 2006. – Т. 8, № 2. – С. 151-172.

101. Yan F. Probiotics: progress toward novel therapies for intestinal diseases / F. Yan, D. B. Polk // *Curr Opin Gastroenterol.* – 2010. – Vol. 26. – P. 95-101.

102. A probiotic mixture alleviates symptoms in irritable bowel syndrome patients: a controlled 6-month intervention / K. Kajander, K. Hatakka, T. Poussa [et al.] // *Aliment Pharmacol Ther.* – 2005. – Vol. 22. – P. 387-394.

103. Боймиструк Т. П., Роль мікрофлори у розвитку хронічного пієлонефриту в дітей / Т. П. Боймиструк, В. Ф. Лобода / *Інфекц. хвороби.* – 2002. - № 3. – С. 44-46.

104. Воробьев А. А. Особенности микрофлоры толстого кишечника при инфекционном эндокардите / А. А. Воробьев, Л. О. Иноземцева, Ю. В. Несвижский [и др.] // *Ж. микробиол., эпидемиол., иммунол.* – 1996. – № 1. – С. 70-74.

105. Effect of milk products fermented by *Bifidobacterium longum* on blood lipids in rats and healthy adult male volunteers / J. Z. Xiao, S. Kondo, N. Takahashi [et al.] // *J Dairy Sci.* – 2003. – Vol. 86. – P. 2452-2461.

106. Probiotics, soluble fiber, and L-Glutamine (GLN) reduce nelfinavir (NFV)- or lopinavir/ritonavir (LPV/r)-related diarrhea / C. R. Heiser, J. A. Ernst, J. T. Barrett [et al.] // *J Int Assoc Physicians AIDS Care.* – 2002. – Vol. 3. – P. 121-129.

107. Short-term consumption on probiotic-containing cheese and its effect on dental caries risk factor / A. J. Ahola, H. Yli-Knuutila, T. Suomalainen [et al.] // Arch Oral Biol. – 2002. – Vol. 47. – P. 799-804.

108. Efficacy of *Lactobacillus* GG in prevention of nosocomial diarrhea in infants / H. Szajevska, M. Kotowska, J. Z. Mrućowicz [et al.] // J Pediatr. – 2001. – Vol. 138. – P. 361-365.

109. Randomized clinical trial of specific *Lactobacillus* and fibre supplement to early enteral nutrition in patients with acute pancreatitis / A. Olah, T. Belagyi, A. Issekutz // Br J Surg. – 2002. – Vol. 89. – P. 1103-1107.

110. Probiotics feeding in prevention of urinary tract infection, bacterial sepsis and necrotizing enterocolitis in preterm infants / C. Dani, R. Biadoioli, G. Bertini [et al.] // Biol Neonate. – 2002. – Vol. 82. – P. 103-108.

111. Wagner R. D. Biotherapeutic effects of probiotics bacteria on candidiasis in immunodeficient mice / R. D. Wagner, C. Pierson, T. Wagner [et al.] // Infect Immun. – 1997. – Vol. 65. – P. 4165-4172.

112. Hoesl C. E. The probiotic approach: an alternative treatment option in urology / C. E. Hoesl, J. E. / Altwein Eur. – 2005. – Vol. 47. – P. 288-296.

113. Safety of probiotics that contain lactobacilli or biridobacteria / S. P. Borriello, W. P. Hammes, W. Holzapfel [et al.] // Clin Infect Dis. – 2003. – Vol. 36. – P. 775-780.

114. Marteau P. Probiotics and health: new facts and ideas / P. Marteau, P. Seksik, R. Jian // Curr Opin Biotechnol. – 2002. – Vol. 13. – P. 486-489.

115. Snyderman D. R. The safety of probiotics / D. R. Snyderman // Clin Infect Dis. – 2008. – Vol. 46. – P. S104-S111, S144-S151.

116. Мурзін О. Б. Європейська конвенція про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей / О. Б. Мурзін // Посібник до практичних занять з фізіології людини. – Дніпропетровськ: Видавництво Дніпропетровського університету, 2004. – С. 135-148.

117. Биомедицинская этика / [под ред. В. И. Покровского]. – М.: Медицина, 1997. – 224 с.

- 118.Лаповець Л. Є. Посібник з лабораторної імунології / Л. Є. Лаповець, Б. Д. Луцик – Львів, 2002. – 173 с.
- 119.Boyum A. Separation of lymphocytes, lymphocyte subgroups and monocytes: a review / A. Boyum // *Lymphology*. – 1977. – Vol. 10. – P. 71-76.
- 120.Chan D.W. Immunoassay / D. W. Chan, N. T. Perlstein // *A Practical Guide*, Eds., Academic Press: New York, 1987 – 71 p.
- 121.Analysis of nitrate, nitrit and [15N] nitrate in biological fluids / L. C. Green, A. W. David, J. Glogowski [et al.] // *Anal. Biochem.* – 1982. – Vol. 126, № 1. – P. 131–138.
- 122.Hevel J. M. Purification of the inducible murine macrophage nitric oxide synthase / J. M. Hevel, K. A. White, M. A. Marletta // *J. Biol. Chem.* – 1991. – Vol. 266, № 34. – P. 22789–22791.
- 123.Современные методы в биохимии / [под ред. Ореховича В.Н.]. – М.: Медицина, 1977. – С. 62-68.
- 124.Чевари С. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологических материалах / С. Чевари, И. Чаба, Й. Секей // *Лабораторное дело*. – 1985. – Вып. 11. – С. 678-681.
- 125.Метод определения активности каталазы / М. А. Королюк, Л. И. Иванова, И. Г. Майорова и др.// *Лабораторное дело*. – 1988. – Вып. 1. – С. 16-18.
- 126.Mokrasch L. C. Glutathione content of cultured cells and rodent brain regions: a spesific fluorometric assay / L. C. Mokrasch, E. J. Teschke // *Analytical Biochemistry*. – 1984. – № 140. – P. 506-509.
- 127.Hissin P. J. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues / P. J. Hissin, R. Hilf // *Analytical Biochemistry* – 1976. – V. 74 – P. 214-226.
- 128.Власова С. Н. Активность глутатионзависимых ферментов эритроцитов при хронических заболеваниях печени у детей / С. Н. Власова, Е. И. Шабунина, И. А. Персегина // *Лаб. дело*. – 1990. – №8. – С. 19–22.

129. Habig W. H. Glutathione-S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation / W. H. Habig, M. J. Parst, W. B. Jakob // *J. Biol. Chem.* – 1974. – V. 249, № 22. – P. 7130-7139.

130. Sensitivity of mouse lymphoid and nonlymphoid organs to Silesian air pollutants / E. Kozłowska, J. Kopec-Szlezak, N. Drela [et al.] // *Ecotoxicol Environ Saf.* – 1997. – 37(1). – P. 10-16.

131. Лимфоциты: Методы / [Хант С., Мейсон Д., Пенхейл Д. и др.]; пер. с англ. под ред. Дж. Клауса. – М.: Мир, 1990. – 395с.

132. Stimulation of the interferon synthesis in mice with various tumors by thymic factor thymoinductin: thesis of IIIrd Balkan Congress of Immunology, 23-27 June. 2001 – Athens, Greece, 2001. – 112-114 p.

133. Role of interferon and 2',5'-oligoadenylate synthetase in erythroid differentiation of Friend leukemia cells / N. Mechti, E. Affabris, G. Romeo [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1984. – V. 259, № 5. – P. 3261-3265.

134. Justensen J. Spectrophotometric pyrophosphate assay of 2',5'-oligoadenylate synthetase / J. Justensen, N. O. Kjeldgaard // *Anal. Biochem.* – 1992. – V. 207, № 1. – P. 90-93.

135. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for quantities of utilizing the principle of protein binding / M. M. Bradford // *Analytical Biochemistry.* – 1976. – V. 86. – P. 193-200.

136. Брандт З. Статистические методы анализа наблюдений. / Брандт З. – М.: Мир, 1975. – 312с.

137. Нарушение нормального состава кишечных бактерий: клиническое значение и вопросы терапии / Э. П. Яковенко, А. Н. Иванов, А. В. Казарина [и др.] // *Рус. Мед. журнал: Болезни органов пищеварения.* – 2008. – Т. 10, № 2. – С. 41-47.

138. Martinsen T. C. Gastric juice: a barrier against infectious diseases / T. C. Martinsen, K. Bergh, H. L. Waldum // *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* – 2005. – Vol. 96. – P. 94-102.

139. Non-*Helicobacter pylori* bacterial flora during acid-suppressive therapy: differential findings in gastric juice and gastric mucosa / S. Sanduleanu, D. Jonkers, A. De Bruine [et al.] // *Aliment Pharmacol Ther.* – 2001. – Vol. 15. – P. 379–388.

140. Husebye E. The pathogenesis of gastrointestinal bacterial overgrowth / E. Husebye // *Chemotherapy.* – 2005. – Vol. 51. – P. 1-22.

141. Naylor G. Role of bacterial overgrowth in the stomach as an additional risk factor for gastritis / G. Naylor, A. Axon // *Can J Gastroenterol.* – 2003. – Vol. 17. – P. 13B-17B.

142. Houben G. M. Bacteria in the aetio-pathogenesis of gastric cancer: a review / G. M. Houben, R. W. Stockbrügger // *Scand J Gastroenterol.* – 1995. – Vol. 212. – P. 13-18.

143. Correa P. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process. First American Cancer Society award lecture on cancer epidemiology and prevention / P. Correa // *Cancer Res.* – 1992. – Vol. 52. – P. 6735-6740.

144. Meuwissen S. G. Gastric mucosal morphological consequences of acid suppression: a balanced view / S. G. Meuwissen, M. E. Craanen, E. J. Kuipers // *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* – 2001. – Vol. 15. – P. 497–510.

145. Willams C. Review article: proton pump inhibitors and bacterial overgrowth / C. Willams, K. E. L. McColl // *Alimentary Pharmacology & Therapeutics.* – 2006. – Vol. 23, № 1. – P. 3-10.

146. Review article: potential gastrointestinal effects of long-term acid suppression with proton pump inhibitors / L. Laine, D. Ahnen, C. McC Lain [et al.] // *Alimentary Pharmacology & Therapeutics.* – 2000. – Vol. 14, № 6. – P. 651-668.

147. Leonard J. Systematic Review of the Risk of Enteric Infection in Patients Taking Acid Suppression / J. Leonard, J. K. Marshall, P. Moayyedi // *American Journal of Gastroenterology.* – 2007. – Vol. 102, № 9. – P. 2047-2056.

148. Waldum H. L. Long-term safety of proton pump inhibitors: risks of gastric neoplasia and infections / H. L. Waldum, E. Brenna, A. K. Sandvik // *Expert Opin Drug Saf.* – 2002. – Vol. 1. – P. 29-38.

149. Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics / P. R. Marteau, M. Vrese, C. J. Cellier [et al.] // *American Journal of Clinical Nutrition*. – 2001. – Vol. 73, № 2. – P. 430S-436S.

150. Сереброва С. Ю. Терапия язвенной болезни и проблемы сохранения микроэкологии желудочно-кишечного тракта / С. Ю. Сереброва, О. В. Добровольский // *Русский Медицинский Журнал*. – 2007. – Т. 15, № 16. – С. 1-7.

151. Gastrin-histamine sequence in the regulation of gastric acid secretion / H. L. Waldum, A. K. Sandvik, E. Brenna [et al.] // *Gut*. – 1991. Vol. 32. – P. 698–701.

152. Synergistic interaction between hypergastrinemia and *Helicobacter* infection in a mouse model of gastric cancer / T. C. Wang, C. A. Dangler, D. Chen [et al.] // *Gastroenterology*. – 2000. – Vol. 118. – P. 36–47.

153. An OmpA-Like Protein from *Acinetobacter* spp. Stimulates Gastrin and Interleukin-8 Promoters / E. Ofori-Darko, Y. Zavros, G. Rieder [et al.] // *Infection and Immunity*. – 2000. – Vol. 68, № 6. – P. 3657-3666.

154. Endogenous nitric oxide in the regulation of gastric secretory and motor activity in humans / J. W. Konturek, H. Fischer, P. M. Gromotka [et al.] // *Aliment Pharmacol Ther*. – 1999. – Vol. 13. – P. 1683–1691.

155. Serum gastrin concentration affects the self replication rate of the enterochromaffin like cells in the rat stomach / Y. Tielemans, J. Axelson, F. Sundler [et al.] // *Gut*. – 1990. – Vol. 31. – P. 274–278.

156. Gastrin-mediated effects of omeprazole on rat colon mucosa / M. E. Klingensmith, L. J. Neville, E. Delpire [et al.] // *Surgery*. – 1999. – Vol. 126, № 2. – P. 272-278.

157. Fossmark R. Gastric cancer: Animal studies on the risk of hypoacidity and hypergastrinemia / R. Fossmark, G. Qvigstad, H. L. Waldum // *World Journal of Gastroenterology*. – 2008. – Vol. 14. – P. 1646-1651.

158. Rectal cell proliferation and colon cancer risk in patients with hypergastrinaemia / M. Renga, G. Brandi, G. M. Paganelli [et al.] // *Gut*. – 1997. – Vol. 41. – P. 330-332.

159. Koop H. Serum gastrin levels during long-term omeprazole treatment / H. Koop, M. Klein, R. Arnold // *Aliment Pharmacol Therap.* – 1990. – Vol. 4. – P. 131-138.

160. Influence of long-term gastric acid suppression therapy on the expression of serum gastrin, chromogranin A, and ghrelin / B. W. Kim, B. I. Lee, H. K. Kim [et al.] // *Display Settings: Korean J Gastroenterol.* – 2009. – Vol. 53. – P. 84-89.

161. Вороніна О., Ультрaструктурний аналіз клітин слизової оболонки фундального відділу шлунка щурів при гіпергастринемії / О. Вороніна, В. Грищук, М. Держинський // *Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Біологія.* – 2007. – № 49. - С. 13-15.

162. Probiotic is preventive agent against structural and functional changes in stomach evoked by long-term reduction of gastric acid secretion: abstract book ["GASTRO 2009 UEGW/WCOG"], (London, United Kingdom, 21-25 November 2009) / *Gut*. – 2009. – Vol. 58 (Supplement II). – A124-A125.

163. Порівняльна характеристика впливу мультипробіотиків «Симбітер® ацидофільний» концентрований та «Апібакт®» на морфометричні показники слизової оболонки товстої кишки щурів за умов тривалої гіпергастринемії / О. М. Радчук, О. Г. Короткий, О. І. Цирюк [та ін.] // *Вісник морфології.* – 2009. – № 15(1). – С. 7-12.

164. Clavel T. Molecular interactions between bacteria, the epithelium, and the mucosal immune system in the intestinal tract: implications for chronic inflammation / T. Clavel, D. Haller // *Curr issues intestinal Microbiol.* – 2007. – Vol. 8. – P. 25-43.

165. Wallace J. L. The cellular and molecular basis of gastric mucosal defence / J. L. Wallace, D. N. Granger // *FASEB J.* – 1996. – Vol. 10. – P. 731–740.

166. Wallace J. L. Inflammatory Mediators in Gastrointestinal Defense and Injury / J. L. Wallace, L. Ma // *Exp. Biol. Med.* – 2001. – Vol. 226. – P. 1003-1015.

167.Ройт А. Иммунология / Ройт А., Бростофф Дж., Мейл Д; пер. с англ. – М.: Мир, 2000. – 592 с.

168. Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1, and tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF / R. Schindler, J. Mancilla, S. Endres [et al.] // *Blood*. – 1990. – Vol. 75. – P. 40-47.

169. Immunology: the immune system in health and disease: Fifth edition / [Jeneway C. A., Travers P., Walport M., Shlomchik M.]. – New York; London: Garland Publishing, 2002. – 732 p.

170. Телетаева Г. М. Цитокины и противоопухолевый иммунитет / Г. М. Телетаева // *Практическая онкология*. – 2007. – Т. 8, № 4. – С. 211-218.

171. Beales I. L. Effect of pro-inflammatory cytokines on acid secretion / I. L. Beales // *Dig. Dis. Sci.* – 2000. – Vol. 45. – P. 289-290.

172. Saperas E. Central interleukin-1 β -induced inhibition of acid secretion in rats: specificity of action / E. Saperas, Y. Tache // *Life Sci.* – 1993. – Vol. 52. – P. 785-792.

173. Zavros Y. Modulating the cytokine response to treat Helicobacter gastritis / Y. Zavros, J. L. Merchant // *Biochem Pharmacol.* – 2005. – Vol. 69. – P. 365-371.

174. Al-Sadi R. Mechanism of cytokine modulation of epithelial tight junction barrier / R. Al-Sadi, M. Boivin, T. Ma [et al.] // *Front Biosci.* – 2009. – Vol. 14. – P. 2765-2778.

175. Role of Cytokine Polymorphisms in the Risk of Distal Gastric Cancer Development / G. I. Perez, E. Garza-Gonzalez, C. Portal [et al.] // *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* – 2005. – Vol. 14, № 8. – P. 1869-1873.

176. Macarthur M. Inflammation and Cancer II. Role of chronic inflammation and cytokine gene polymorphisms in the pathogenesis of gastrointestinal malignancy / M. Macarthur, G. L. Hold, E. M. El-Omar // *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* – 2004. – Vol. 286. – P. G515-520.

177. Merchant J. L. Inflammation, Atrophy, Gastric Cancer: Connecting the Molecular Dots / J. L. Merchant // *Gastroenterology*. – 2005. – Vol. 129. – P. 1079-1082.

178. Микрофлора кишечника и механизмы иммунорегуляции / С. С. Хромова, А. Н. Шкопоров, Б. А. Ефимов [и др.] // *Вопросы детской диетологии*. – 2005. – Т. 3, № 1. – С. 92–96.

179. Pattern of Cytokine Responses to Gram-Positive and Gram-Negative Commensal Bacteria Is Profoundly Changed when Monocytes Differentiate into Dendritic Cells / H. Karlsson, P. Larsson, A. E. Wold [et al.] // *Infect Immun*. – 2004. – Vol. 72, № 5. – P. 2671-2678.

180. Patterns of cytokine induction by gram-positive and gram-negative probiotic bacteria / M. L. Cross, A. Ganner, D. Teilab [et al.] // *FEMS Immunol Med Microbiol*. – 2004. – Vol. 42, № 2. – P. 173-180.

181. Cytokine induction by Gram-positive bacteria / C. Draing, S. Sigel, S. Deininger [et al.] // *Immunobiology*. – 2008. – Vol. 213, № 3-4. – P. 285-296.

182. Increased tumor necrosis factor alpha production in Chron s disease can be downregulated ex vivo by probiotic bacteria / N. Borrueal, M. Carol, F. Casellas [et al.] // *Gut*. – 2002. – Vol. 51. – P. 659-664.

183. Probiotic intervention has strain-specific anti-inflammatory effects in healthy adults / R. A. Kekkonen, N. Lummela, H. Karjalainen [et al.] // *World J Gastroenterol*. – 2008. – Vol. 14, № 13. – P. 2029-2036.

184. Probiotic therapy in the prevention of pouchitis onset: decreased interleukin-1beta, interleukin-8, and interferon-gamma gene expression / K. M. Lammers, A. Vergopoulos, N. Babel [et al.] // *Inflamm Bowel Dis*. – 2005. – Vol. 11, № 5. – P. 447-454.

185. Role of arginine metabolism in immunity and immunopathology / E. Peranzoni, I. Marigo, L. Dolcetti [et al.] // *Immunobiology*. – 2007. – Vol. 212, № 9–10. – P. 795–812.

186. Nitric oxide production and signaling in inflammation / R. Korhonen, A. Lahti, H. Kankaanranta [et al.] // *Curr. Drug. Targets Inflamm. Allergy.* – 2005. – Vol. 4, № 4. – P. 471–479.

187. Mannick J. B. Immunoregulatory and antimicrobial effects of nitrogen oxides / J. B. Mannick // *Proc. Am. Thorac. Soc.* – 2006. – Vol. 3. – P. 161–165.

188. Bogdan C. Nitric oxide and the immune response / C. Bogdan // *Nat. Immunol.* – 2001. – Vol. 2. – P. 907–916.

189. Nathan C. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens / C. Nathan, M. Shiloh // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 2000. – Vol. 97, № 16. – P. 8841–8848.

190. Оксид азота в механизмах патогенеза внутриклеточных инфекций / С. Я. Проскуряков, С. И. Бикетов, А. И. Иванников [и др.] // *Иммунология.* – 2000. – № 4. – С. 9–20.

191. Extensive nitration of protein tyrosines in human atherosclerosis detected by immunohistochemistry / J. S. Beckmann, Yz. Ye, P. G. Anderson [et al.] // *Biol. Chem. Hoppe Seyler.* – 1994. – Vol. 375. – P. 81–88.

192. Beckmann J. S. Nitric oxide, superoxide and peroxynitrite: the good, the bad and ugly / J. S. Beckmann, W. H. Koppenol // *Am. J. Physiol.* – 1996. – Vol. 271. – P. 1424–1437.

193. Regulation of the immune response by nitric oxide differentially produced by Th1 and Th2 cells / A. W. Taylor Robinson, F. Y. Liew, A. Severn [et al.] // *Eur. J. Immunol.* – 1994. – Vol. 24. – P. 980–984.

194. Nitric oxide preferentially induces type 1 T-cell differentiation by selectively up-regulating IL-12 receptor β 2 expression via cGMP / W. Niedbala, X. Q. Wei, C. Campbell [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2002. – Vol. 99. – P. 16186–16191.

195. Endothelial nitric oxide synthase regulates T cell receptor signaling at the immunological synapse / S. Ibiza, V. M. Victor, I. Bosca [et al.] // *Immunity.* – 2006. – Vol. 24. – P. 753–765.

196. Nitric oxide contributes to the development of a postinjury Th2 T-cell phenotype and immune dysfunction / T. Daniel, M. Alexander, W. J. Hubbard [et al.] // *J. Cell. Physiol.* – 2006. – Vol. 208. – P. 418-427.

197. Nitric Oxide Mediates T Cell Cytokine Production and Signal Transduction in Histidine Decarboxylase Knockout Mice / A. Koncz, M. Pasztoi, M. Mazan [et al.] // *J. Immunol.* – 2007. – Vol. 179. – P. 6613-6619.

198. Brecht D.S. Endogenous nitric oxide synthesis: biological functions and pathophysiology / D. S. Brecht // *Free Radical Res.* – 1999. – Vol. 31. – P. 577–596.

199. Role of Nitric Oxide in Physiology and Pathology of the Gastrointestinal Tract / A. Stanek, A. Gadowska-Cicha, K. Gawron [et al.] // *Mini Reviews in Medicinal Chemistry.* – 2008. – Vol. 8, № 14. – P. 1549-1560.

200. Elliott S. N. Nitric oxide: a regulator of mucosal defense and injury / S. N. Elliott, J. L. Wallace // *J Gastroenterol.* – 1998. – Vol. 33, № 6. – P. 792-803.

201. Schubert M. L. Gastric exocrine and endocrine secretion / M. L. Schubert // *Curr Opin Gastroenterol.* – 2009. – Vol. 25, № 6. – P. 529-536.

202. Popovic P. J. Arginine and Immunity / P. J. Popovic, H. J. Zeh, J. B. Ochoa // *J. Nutr.* – 2007. – Vol. 137. – P. 1681S-1686S.

203. Nitric oxide in gastrointestinal health and disease / V. Shah, G. Lyford, G. Gores [et. al.] // *Gastroenterology.* – 2004. – Vol. 126, № 3. – P. 903 - 913.

204. Вплив L-аргініну на вікові зміни процесів пероксидного окислення ліпідів та активність системи антиоксидантного захисту у тканинах щурів / К. Мурашук, О. Іккерт, М. Гальків [та ін.] // *Укр. біохім. журн.* – 2007. – Т. 79, № 3. – С. 38-43.

205. Владимиров М. В. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах / М. В. Владимиров, А. И. Арчаков– М: Наука, 1972. – С44-78.

206. Редокс-регуляция клеточных функций / О. Н. Октябрьский, Г. В. Смирнова [и др.] // *Биохимия.* – 2007. – Т. 72, № 2. – С. 158-174.

207. Mead J. F. Free radicals mechanisms in lipid peroxidation and prostaglandins / J. F. Mead // *Free radicals in molecular biology, aging and disease.* – New York: Raven Press, 1984. – P.53–66.

208.Дубинина Е. Е. Роль активних форм кислорода в качестве сигнальных молекул в метаболизме тканей при состоянии окислительного стресса / Е. Е. Дубинина // Вопр.мед.химии. – 2001. – Т. 47, № 6. – С. 561-581.

209.Кашулина А. П. Роль перекисного свободнорадикального окисления в патологии и методы его изучения / А. П. Кашулина, Е. Н. Сотникова // Мед. консультация. – 1996. – №2. – С. 20-24.

210.Барабой В. А. Окислительно-антиоксидантный гомеостаз в норме и патологии / В. А. Барабой, Д. А. Сутковой – Киев: Наук. думка, 1997. – 420 с.

211.Elisabeth F. The effect of daily consumption of probiotic and conventional yoghurt on oxidant and anti oxidant parameters in plasma of young healthy women / F. Elisabeth, E. Ibrahim // International journal for vitamin and nutrition research. – 2007. – Vol. 77, № 2. – P. 79-88.

212.Lin M. Inhibition of Lipid Peroxidation by *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium longum* / M. Lin, C. Yen // J. Agric. Food Chem. – 1999. – Vol. 47, № 9. – P. 3661–3664.

213.Effects of a synbiotic product on blood antioxidative activity in subjects colonized with *Helicobacter pylori* / P. Hütt, H. Andreson, T. Kullisaar [et al.] // Letters in Applied Microbiology. – 2009. – Vol. 48, № 6. – P. 797-800.

214.Сарапук О. В. Корекція перекисного окислення ліпідів та антиоксидантний захист у хворих на хронічний гастрит із секреторною недостатністю / О. В. Сарапук, А. О. Клименко, В. В. Дзвонковська // Сучасна гастроентерологія. – 2002. – №2. – С. 59-61.

215.Burdan F. Level of malondialdehyde after short-time omeprazole administration / F. Burdan, B. Burak, A. Sek // Med Sci Monit. – 2001. – Vol. 7. – P. 89-92.

216.A novel antioxidant and antiapoptotic role of omeprazole to block gastric ulcer through scavenging of hydroxyl radical / K. Biswas, U. Bandyopadhyay, I. Chattopadhyay [et al.] // J Biol Chem. – 2003. – Vol. 278. – P. 10993-11001.

217. Антиоксидантна система захисту організму / І. Ф. Беленічев, Е. Л. Левицький, Ю. І. Губський [та ін.] // Совр. пробл. токсикол. – 2003. – № 2. – С. 32–38.

218. Liochev S. Zinc Superoxide Dismutase and H_2O_2 / S. Liochev, I. Fridowich // The Journal of biological chemistry. – 2002. – Vol. 277, № 38. – P. 34674–3468.

219. Elchuri S. CuZnSOD deficiency leads to persistent and widespread oxidative damage and hepatocarcinogenesis later in life / S. Elchuri, T. Oberley // Oncogene. – 2005. – Vol. 24. – P. 367-380.

220. Uchida K. Identification of Oxidized Histidine Generated at the Active Site of Cu,Zn-Superoxide Dismutase Exposed to H_2O_2 / K. Uchida, S. Kawakishi // The Journal of biological chemistry. – 1994. – Vol. 269, № 4. – P. 2405–2410.

221. Северина И. С. NO: новый взгляд на механизм действия старых лекарств / И.С. Северина // Биомедицинская химия. – 2005. – Т. 51, № 1. – С. 19-29.

222. Лю Б. Н. Кислородно-перекисная концепция апоптоза и возможные варианты его механизма / Б. Н. Лю // Успехи современной биологии. – 2001. – Т. 121, № 5. – С. 488-501.

223. Eaton J. W. Catalases and peroxidases and glutathione and hydrogen peroxide: mysteries of the bestiary / J. W. Eaton // J. Lab. And Clin. Med. – 1991. – V. 118, № 1. – P. 3-4.

224. Gastroprotective and Antioxidant Effects of Amiodarone on Indomethacin-induced Gastric Ulcers in Rats / D. G. Ozbakis, F. Odabasoglu, Z. Halici [et al.] // Arch. Pharm. Res. – 2007. – Vol. 30, № 11. – P. 1426-1434.

225. Elchuri S. CuZnSOD deficiency leads to persistent and widespread oxidative damage and hepatocarcinogenesis later in life / S. Elchuri, T. Oberley // Oncogene. – 2005. – Vol. 24. – P. 367-380.

226. Forman H. J. Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis / H. J. Forman, H. Zhang, A. Rinna // Molecular Aspects of Medicine. – 2009. – Vol. 30, № 1-2. – P. 1-12.

227. Барабой В. А. Биоантиоксиданты / В. А. Барабой. – К.: Книга плюс, 2006. – 462 с.

228. De Minicis S. Oxidative stress in alcoholic liver disease: role of NADPH oxidase complex. / S. De Minicis, D. A. Brenner // *J Gastroenterol Hepatol.* – 2008. – Vol. 23. – P. 98-103.

229. Mates M. Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes / M. Mates, F. Sanchez-Jimenez // *Front. Biosci.* – 1999. – Vol. 4. – P. 339-345.

230. Кулинский В. И. Структура, свойства, биологическая роль и регуляция глутатионпероксидазы / В. И. Кулинский, Л. С. Колесниченко // *Усп. Совр. Биологии.* – 1993. – Т. 113, №1. – С. 107-122.

231. Lin M. Y. Antioxidative ability of lactic acid bacteria / M. Y. Lin, C. L. Yen // *J Agric Food Chem.* – 1999. – Vol. 47, № 4. – P. 1460-1466.

232. Ускова М. А. Антиоксидантные эффекты молочнокислых бактерий – пробиотиков и йогуртных заквасок / М. А. Ускова, Л. В. Кравченко // *Вопр. питания* – 2009. – № 2. – С. 18-23.

233. Pickett C. B. Glutathione S-transferases: gene structure, regulation, and biological function / C. B. Pickett // *Annu. Rev. Biochem.* – 1989. – Vol. 58. – P. 743-764.

234. Кахновер Н. Б. Глутатион-S-трансферазы, ферменты детоксикации / Н. Б. Кахновер, Ю. В. Хмелевский // *Укр. биохим. журн.* – 1983. – Т. 55. – №1. – С. 86-92.

235. Samiec P. S. Glutathione S-Transferase in Mucus of Rat Small Intestine / P. S. Samiec, L. J. Dahm, D. P. Jones // *Toxicological sciences.* – 2000. – Vol. 54. – P. 52-59.

236. Jakoby W. B. The Enzymes of Detoxication / W. B. Jakoby, D. M. Ziegler [at al.] // *The Journal of Biological Chemistry.* – 1990. – Vol. 265, № 34. – P. 20715-20718.

237. Weidolf L. A metabolic route of omeprazole involving conjugation with glutathione identified in the rat / L. Weidolf, K. E. Karlsson, I. Nilsson // *Drug Metab Dispos.* – 1992. – Vol. 20, № 2. – P. 262-267.

238. Zhong D. Metabolism of pantoprazole involving conjugation with glutathione in rats / D. Zhong, Z. Xie, X. Chen // *J Pharm Pharmacol.* – 2005. – Vol. 57, № 3. – P. 341-349.

239. Чернов Н. Н. Латентная форма глутатионредуктазы в печени крыс / Н. Н. Чернов // *Биохимия.* – 1986. – Т. 51, вып. 5. – С. 762-769.

240. Кулинский В. И. Обмен глутатиона / В. И. Кулинский, Л. С. Колесниченко // *Усп. Совр. Биол.* – 1990. – Т. 31. – С. 157-179.

241. Peroxy nitrite modification of glutathione reductase: modeling studies and kinetic evidence suggest the modification of tyrosines at the glutathione disulfide binding site / D. Francescutti, J. Baldwin, L. Lee [et al.] // *Protein Engineering.* – 1996. – Vol. 9, № 2. – P. 189-194.

242. Alderton W. K. Nitric oxide synthases : structure, function and inhibition / W. K. Alderton, C. E. Cooper, R. G. Knowles // *Biochem. J.* – 2001. – Vol. 357. – P. 593-615.

243. Alican I. A critical role for nitric oxide in intestinal barrier function and dysfunction / I. Alican, P. Kubes // *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* – 1996. – Vol. 270, № 2. – P. 225-237.

244. Nitrite in saliva increases gastric mucosal blood flow and mucus thickness / H. H. Bjorne, J. Petersson, M. Phillipson [et al.] // *J Clin Invest.* – 2004. – Vol. 113. – P. 106-114.

245. Lippe I. T. Participation of endothelium-derived nitric oxide but not prostacyclin in the gastric mucosal hyperaemia due to acid back-diffusion / I. T. Lippe, P. Holzer // *Br J Pharmacol.* – 1992. – Vol. 105. – P. 708-714.

246. Novel nonsteroidal anti-inflammatory drug derivatives with markedly reduced ulcerogenic properties in the rat / J. L. Wallace, B. Reuter, C. Cicala [et al.] // *Gastroenterology.* – 1994. – Vol. 107. – P. 173-179.

247. Kubes P. Nitric oxide as a mediator of gastrointestinal mucosal injury? - Say it ain't so / P. Kubes, J. L. Wallace // *Mediators of Inflammation*. – 1995. – Vol. 4. – P. 397-405

248. NO-aspirin protects from T cell-mediated liver injury by inhibiting caspase-dependent processing of Th1-like cytokines / S. Fiorucci, L. Santucci, E. Antonelli [et al.] // *Gastroenterology*. – 2000. – Vol. 118. – P. 404-421.

249. Fang F. C. Perspectives series: host/pathogen interactions. Mechanisms of nitric oxide-related antimicrobial activity / F. C. Fang // *J Clin Invest*. – 1997. – Vol. 99. – P. 2818-2825.

250. Nitric oxide generators and cGMP stimulate mucus secretion by rat gastric mucosal cells / J. F. Brown, A. C. Keates, P. J. Hanson [et al.] // *Am J Physiol*. – 1993. – Vol. 265. – P. G418-G422.

251. Targeting nitric oxide in the gastrointestinal tract / G. Dijkstra, H. Goor, P. L. Jansen [et al.] // *Curr Opin Investig Drugs*. – 2004. – Vol. 5. – P. 529-536.

252. Evidence that nitric oxide mechanisms regulate small intestinal motility in humans / A. Russo, R. Fraser, K. Adachi [et al.] // *Gut*. – 1999. – Vol. 44. – P. 72-76.

253. Konturek J. W. Endogenous nitric oxide in the regulation of gastric secretory and motor activity in humans / J. W. Konturek, H. Fischer, P. M. Gromotka // *Aliment Pharmacol Ther*. – 1999. – Vol. 13. – P. 1683-1691.

254. Kim Y-M. Nitric Oxide as a Bifunctional Regulator of Apoptosis / Y-M. Kim, C. A. Bombeck, T. R. Billiar // *Circulation Research*. – 1999. – Vol. 84. – P. 253-256.

255. Schubert M. L. Gastric secretion / M. L. Schubert // *Curr Opin Gastroenterol*. – 2007. – Vol. 23, № 6. – P. 595-601.

256. Nitric oxide donor-induced hyperpermeability of cultured intestinal epithelial monolayers: role of superoxide radical, hydroxyl radical, and peroxynitrite / M. J. Menconi, N. Unno, M. Smith [et al.] // *Biochim Biophys Acta*. – 1998. – Vol. 1425. – P. 189-203.

257. Букин Ю. В. Молекулярно-биологические механизмы гастроканцерогенеза и подходы к профилактике рака желудка / Ю. В. Букин, В.

А. Драунин-Крыленко // Успехи биологической химии. – 2000. – Т. 40. – С. 329-356.

258. Nitric oxide-mediated inhibition of DNA repair potentiates oxidative DNA damage in cholangiocytes / M. Jaiswal, N. F. LaRusso, R. A. Shapiro [et al.] // *Gastroenterology*. – 2001. – Vol. 120. – P. 190-199.

259. Kroncke K. D. Inducible nitric oxide synthase in human diseases / K. D. Kroncke, K. Fehsel, V. Kolb-Bachofen // *Clin Exp Immunol*. – 1998. – Vol. 113. – P. 147–156.

260. Heme-dependent and heme-independent nitrite reduction by lactic acid bacteria results in different N-containing products / G. Wolf, E. K. Arendt, U. Pfahler [et al.] // *Int J Food Microbiol*. – 1990. – Vol. 10. – P. 323–329.

261. Bacterial nitrite-reducing enzymes / T. Brittain, R. Blackmore, C. Greenwood [et al.] // *Eur J Biochem*. – 1992. – Vol. 209. – P. 793–802.

262. The effect of intra-gastric acidity and flora on the concentration of N-nitroso compounds in the stomach / F. Viani, H. H. Siegrist, B. Pignatelli [et al.] // *Eur. J. Gastroenterol Hepatol*. – 2000. – Vol. 12. – P. 165-173.

263. Generation of NO by probiotic bacteria in the gastrointestinal tract / T. Sobko, L. Huang, T. Midtvedt [et al.] // *Free Radic Biol Med*. – 2006. – Vol. 41, № 6. – P. 985-991.

264. Гаврилюк Н. С. Состояние окислительного гомеостаза при хронических эрозивных состояниях желудка с обоснованием патогенетической терапии / Н. С. Гаврилюк // *Український терапевтичний журнал*. – 2008. – № 4. – С. 80-87.

265. Звягинцева Т. Д. Патогенетические механизмы липопероксидации и антирадикальной защиты в развитии язвенной болезни двенадцатиперстной кишки / Т. Д. Звягинцева, А. И. Чернобай, Дах ер Джордж М. // *Сучасна гастроентерологія*. – 2002. – № 1. – С. 49-52.

266. Mitochondrial lipid peroxides and antioxidant enzymes in colorectal adenocarcinoma tissues / O. Kanbalgi, G. Ozdemirler, T. Bulut [et al.] // *Gastroenterology*. – 2001. – Vol. 59, № 4. – P. 205.

267. Проблемы нарушений окислительного гомеостаза и антиоксидантной терапии / Л. М. Овсянникова, С. М. Алехина, О. В. Дробинская [и др.] // Гастроэнтерология. – 2001. – Т. 3. – С. 322-327.

268. Поставный В. Е. Перекисное окисление липидов и антиоксидантная система в динамике лечения больных хроническим гастритом / В. Е. Поставный // Лікарська справа. – 2005. – № 8. – С. 33-38.

269. Lin M. Y. Reactive Oxygen Species and Lipid Peroxidation Product-Scavenging Ability of Yogurt Organisms / M. Y. Lin, C. L. Yen // Journal of Dairy Science. – Vol. 82, № 8. – P. 1629-1634.

270. Roos N. M. Effects of probiotic bacteria on diarrhea, lipid metabolism, and carcinogenesis: a review of papers published between 1988 and 1998 / N. M. Roos, M. B. Katan // Am J Clin Nutr. – 2000. – Vol. 71. – P. 405-411.

271. Дубинина Е.Е. Биологическая роль супероксидного анион-радикала и супероксиддисмутазы в тканях организма // Успехи современной биологии. - 1989. - Т. 108, № 1. - С.3-18.

272. Mikelsaar M. *Lactobacillus fermentum* ME-3 – an antimicrobial and antioxidative probiotic / M. Mikelsaar, M. Zilmer // Microbial Ecology in Health and Disease. – 2009. – Vol. 21, № 1. – P. 1-27.

273. Мазо В. К. Глутатион, как компонент антиоксидантной системы желудочно-кишечного тракта / В. К. Мазо // Рос. журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 1998. – № 1. – С. 47–53.

274. Shin J. M. Differences in binding properties of two proton pump inhibitors on the gastric H⁺,K⁺-ATPase in vivo / J. M. Shin, G. Sachs // Biochem. Pharmacol. – 2004. – Vol. 68, № 11. – P. 2117–2127.

275. Antioxidant properties of omeprazole / D. Lapenna, S. Gioia, G. Ciofani [et al.] // FEBS Letters. – 1996. – Vol. 382, № 1-2. – P. 189-192.

276. Kedika R. R. Potential Anti-inflammatory Effects of Proton Pump Inhibitors: A Review and Discussion of the Clinical Implications / R. R. Kedika // Digestive Diseases and Sciences. – 2009. – Vol. 54, № 11. – P. 2312-2317.

277. Sensitive and selective determination of glutathione in probiotic bacteria by capillary electrophoresis-laser induced fluorescence/ A. Musenga, R. Mandrioli, P. Bonifazi [et al.] // *Anal Bioanal Chem.* – 2007. – Vol. 387. – P. 917–924.

278. *Lactobacillus fermentum*, a probiotic capable to release glutathione, prevents colonic inflammation in the TNBS model of rat colitis / L. Peran, D. Camuesco, M. Comalada [et al.] // *Int J Colorectal Dis.* – 2006. – Vol. 21. – P. 737-746.

279. Yoon Y. H. Occurrence of glutathione sulphhydryl (GSH) and antioxidant activities in probiotic *Lactobacillus spp.* / Y. H. Yoon, J. R. Byun // *Asian-australasian journal of animal sciences.* – 2004. – Vol. 17, № 11. – P. 1582-1585.

280. Клименко Н. А. Морфофункциональное состояние тимуса в динамике хронического иммунного воспаления / Н. А. Клименко, С. В. Татарко, И. В. Сорокина // *Медицина сегодня и завтра.* – 2008. – № 4. – С. 4-8.

281. Zeneca A. Normal Structure, Function and Histology of the Thymus / A. Zeneca, A. Park // *Toxicologic Pathology* – 2006. – Vol. 34, № 5. – P. 504-514.

282. Yarilin A. A. Cytokines in the thymus: production and biological effects / A. A. Yarilin, I. M. Belyakov // *Curr. Med. Chem.* – 2004. – Vol. 11, № 4. – P. 447–464.

283. The effects of the microbial components of the probiotic Acilact on the cell-mediated immunity factors under experimental conditions / T. N. Nikolaeva, V. V. Zorina, V. V. Pospelova [et al.] // *Vestn Ross Akad Med Nauk.* – 2005. – № 12. – P. 40-46.

284. Чиппенс Г. И. Иммунофизиология; [под ред. Е. А. Корневой]. – СПб.: Квартет-А, 1993. – С.632-656.

285. Belokrylov G. A. Stimulation of immunogenesis by neurotensin, pentagastrin and thymopentin and ways of its realization / G. A. Belokrylov, I. V. Molchanova, O. D. Popova // *Biull. Eksp. Biol. Med.* – 1989. – Vol. 108. – P. 584-587.

286. Hirschowitz B. I. Vitamin B12 deficiency in hypersecretors during long-term acid suppression with proton pump inhibitors / B. I. Hirschowitz,

J. Worthington, J. Mohnen // *Aliment Pharmacol Ther.* – 2008. – Vol. 27. – P.1110-1121.

287.Kroupa R. Risk of long-term antisecretory treatment / R. Kroupa, J. Dolina // *Vnitr Lek.* – 2010. – Vol. 56. – P. 115-119.

288.Youssef A. F. Safety and pharmacokinetics of oral lansoprazole in preadolescent rats exposed from weaning through sexual maturity / A. F. Youssef, P. Turck, F. L. Fort // *Reprod. Toxicol.* – 2003. – Vol. 17. – P. 109-116.

289.Olbe L. A proton-pump inhibitor expedition: the case histories of omeprazole and esomeprazole / L. Olbe, E. Carlsson, P. Lindberg // *Nature reviews.* – 2003. – Vol. 2. – P. 132-139.

290.Iron supplementation prevents the development of iron deficiency in rats with omeprazole-induced hypochlorhydria / E. C. Conceicao, T. Shuhama, C. Izumi [et al.] // *Nutrition Research.* – 2001. Vol. 21. – P. 1201–1208.

291.Кадагидзе З. Г. Цитокины / З. Г. Кадагидзе // *Практическая онкология.* – 2003. – Т. 4, № 3. – С. 131-139.

292.Biron C. A. Interferons and other cytokines / C. A. Biron, G. C. Sen // *Fields virology*, 4th ed. Lippincott-Raven. – 2001. – Vol. 59, № 25. – P. 321-351.

293.Активация лимфоцитов (Иммунология) / Эшмен Р. Ф. [под ред. У. Пола]. – М.: Мир, 1987. – Т. 1. – С. 414-469.

294.Влияние интерферона- α/β на транспорт и связывание ионов Ca^{2+} в тимоцитах мыши / Е. В. Долгая, О. М. Рожманова, Л. Н. Стельмах [и др.] // *Биополимеры и клетка.* – 2000. – Т. 16, № 3. – С. 225-228.

295.Тимошок Н. О. Антибактеріальна ефективність індукторів інтерферону різного походження: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня к.б.н.: спец. 03.00.07 "Мікробіологія" / Н. О. Тимошок. – Київ, 2002. – 21 с.

296.Samuel C. E. Antiviral Actions of Interferons / C. E. Samuel // *Clinical Microbiology Reviews.* – 2001. – Vol. 12, № 4. – P. 778-809.

297.Player M. R. The 2-5A system: modulation of viral and cellular processes through acceleration of RNA degradation / M. R. Player, P. F. Torrence // *Pharmacol. Ther.* – 1998. – Vol. 78, № 2. – P. 55-113.

298. Itkes A. V. Oligoadenylate and cyclic AMP: interrelation and mutual regulation / A. V. Itkes // *Prog. Mol. Subcell. Biol.* – 1994. – Vol. 14. – P. 209-221.

299. Cell cycle-dependent modulation of alpha-interferon-inducible gene expression and activation of signaling components in Daudi cells. Interferon-responsive regulatory elements in the promoter of the human 2',5'-oligo(A) synthetase gene / R. Kumar, L. Korutla, K. Zhang [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1994. – Vol. 269. – P. 25437–25441.

300. Ectopic expression of 2–5A synthetase in myeloid cells induces growth arrest and facilitates the appearance of a myeloid differentiation marker / S. Salzberg, T. Hyman, H. Turm [et al.] // *Cancer Res.* – 1997. – Vol. 57. – P. 2732–2740.

301. Yu F. Protein kinase C is required for induction of 2',5'-oligoadenylate synthetases / F. Yu, G. Floyd-Smith // *Exp. Cell Res.* – 1997. – Vol. 234. – P. 240–248.

302. Rebouillat D. The human 2',5'-oligoadenylate synthetase family: interferon-induced proteins with unique enzymatic properties / D. Rebouillat, A. G. Hovanessian // *J. Interferon Res.* – 1999. – Vol. 19. – P. 295-308.

303. Agastya G. Omeprazole inhibits phagocytosis and acidification of phagolysosomes of normal human neutrophils in vitro / G. Agastya, B. C. West, J. M. Callahan // *Immunopharmacol Immunotoxicol.* – 2000. – Vol. 22, № 2. – P. 357-372.

304. Omeprazole Inhibits Natural Killer Cell Functions / H. Alkim, S. Unal, H. Okur [et al.] // *Digestive Diseases and Sciences.* – 2008. – Vol. 53, № 2. – P. 347-351.

305. Samuel C. E. Interferons, interferon receptors, signal transducer and transcriptional activators, and interferon regulatory factors / C. E. Samuel // *The Journal of Biological Chemistry.* – 2007. – Vol. 282, № 28. – P. 20045-20046.

306. Involvement of JAK2 upstream of the PI 3-kinase in cell-cell adhesion regulation by gastrin / A. Ferrand, A. Kowalski-Chauvel, C. Bertrand [et al.] // *Exp Cell Res.* – 2004. – Vol. 301, № 2. – P. 128-138.

307.Sen G. C. The interferon-stimulated genes: targets of direct signaling by interferons, double-stranded RNA, and viruses / G. C. Sen, S. N. Sarkar // CTMI. – 2007. – Vol. 316. – P. 233-250.

308.Uematsu S. Toll-like Receptors and Type I Interferons / S. Uematsu, S. Akira // The Journal of Biological Chemistry. – 2007. – Vol. 282, № 21. – P. 15319–15324.

309.Bandyopadhyay A. Regulation of inducible and neuronal nitric oxide synthase gene expression by interferon-gamma and VIP / A. Bandyopadhyay, S. Chakder, S. Rattan // Am J Physiol. – 1997. – Vol. 272. – P. 1790-1797.

310.Neutrophils: moleculars, functions and pathophysiological aspects / V. Wilko-Sarsat, Ph. Rieu, B. Descamps-Latscha [et al.] // Lab. Invest. – 2000. – Vol. 80. – P. 617–653.

311.Lysle D. T. Endogenous Opioids Regulate the Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase by Splenocytes / D. T. Lysle, T. How // The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. – 1999. – Vol. 288, № 2. – P. 502-508.

312.Murayama T. The actions of NO in central nervous system and in thymocytes / T. Murayama, Y. Nomura // Jpn. J. Pharmacol. – 1998. – Vol. 76. – P. 129-139.

313.Regulation of the immune response by nitric oxide differentially produced by T helper type 1 and T helper type 2 cells / A. W. Taylor-Robinson, F. Y. Liew, A. Severn [et al.] // Eur J Immunol. – 1994. – Vol. 24. – P. 980-984.

314.Nitric oxide increased interleukin-4 expression in T lymphocytes / R. H. Chang, M. H. Feng, W. H. Liu [et al.] // Immunology. – 1997. – Vol. 90. – P. 364-369.

315.Moilanen E. Nitric Oxide in Inflammation and Immune Response / E. Moilanen, H. Vapaatalo // Annals of Medicine. – 1995. – Vol. 27, № 3. – P. 359-367.

316. Сомова Л. М. Оксид азота как медиатор воспаления / Л. М. Сомова, Н. Г. Плехова // Вестник ДВО РАН. – 2006. – № 2. – С. 77-80.

317.S-nitrosylation signaling in cell biology / B. M. Gaston, J. Carver, A. Doctor [et al.] // *Mol Interv.* – 2003. – Vol. 3. – P. 253-263.

318.Duan Sh. S-nitrosylation/Denitrosylation and Apoptosis of Immune Cells / Sh. Duan, Ch. Chen // *Cel. Mol. Immunol.* – 2007. – Vol. 4, № 5. – P. 353-358.

319.Niedbala W. Role of nitric oxide in the regulation of T cell functions / W. Niedbala, B. Cai, F. Y. Liew // *Ann. Rheum Dis.* – 2006. – Vol. 65, Suppl. 3. – P. iii37-iii40.

320.Nitric oxide-dependent mitochondrial biogenesis generates Ca^{2+} signaling profile of lupus T cells / G. Nagy, M. Barcza, N. Gonchoroff [et al.] // *J. Immunol.* – 2004. – Vol. 173. – P. 3676-3683.

321.Derakhshan B. Balancing reactivity against selectivity: the evolution of protein S-nitrosylation as an effector of cell signaling by nitric oxide / B. Derakhshan, G. Hao, S. S. Gross // *Cardiovasc. Res.* – 2007. – Vol. 75, № 2. – P. 210-219.

322.Hancock J.T. The role of redox in signal transduction / J. T. Hancock // *Methods Mol. Biol.* – 2008. – Vol. 476. – P. 1–9.

323.DeRyckere D. Characterization of transcriptional regulation during negative selection in vivo / D. DeRyckere, D. L. Mann, J. DeGregori // *J. Immunol.* – 2003. – Vol. 171. – P. 802–811.

324.Benhar M. A central role for S-nitrosylation in apoptosis / M. Benhar, J. S. Stamler // *Nat Cell Biol.* – 2005. – Vol. 7. – P. 645-646.

325.Albina J. E. Nitric oxide production is required for murine resident peritoneal macrophages to suppress mitogen-stimulated T cell proliferation. Role of IFN-gamma in the induction of the nitric oxide-synthesizing pathway / J. E. Albina, J. A. Abate, W. L. Jr. Henry // *The Journal of Immunology.* – 1991. – Vol. 147, № 1. – P. 144-148.

326.Тотолян А. А. Клетки иммунной системы / А. А. Тотолян, И. С. Фрейдлин. – СПб.: Наука, 2000. – 232 с.

327.Nitric oxide mediates immune dysfunction in the spontaneously hypertensive rat / D. W. Pascual, V. H. Pascual, K. L. Bost [et al.] // *Hypertension.* – 1993. – Vol. 21. – P. 185-194.

328. Omeprazole induces apoptosis in normal human polymorphonuclear leucocytes / E. Capodicasa, P. Cornacchione, B. Natalini // *Int J Immunopathol Pharmacol.* – 2008. – Vol. 21, № 1. – P. 73-85.

329. Macrophage-Derived Nitric Oxide Regulates T Cell Activation via Reversible Disruption of the Jak3/STAT5 Signaling Pathway / R. M. Bingisser, P. A. Tilbrook, P. G. Holt [et al.] // *The Journal of Immunology.* – 1998. – Vol. 160. – P. 5729-5734.

330. Modulation of lymphocytes function by oxidative stress: abstract book of Ann. II winter Conf. Hivermales ["Cellular adaptation to oxidative stress"], (France, 1995). – France, 1995. – P. 1.

331. Fuente M. Anti-oxidants as modulators of immune function / M. Fuente, V. Victor // *Immunology and Cell Biology.* – 2000. – Vol. 78. – P. 49-54.

332. Functions of glutathione and glutathione disulfide in immunology and immunopathology / W. Droge, K. Schulze-Osthoff, S. Mihm [et al.] // *The FASEB Journal.* – 1994. – Vol. 8. – P. 1131-1138.

333. Buttke T. M. Redox Regulation of Programmed Cell Death in Lymphocytes T. M. Buttke, P. A. Sandstrom // *Free Radical Research.* – 1995. – Vol. 22, № 5. – P. 389-397.

334. Горбачева С. М. Биохимические механизмы адаптации при геморрагическом шоке / С. М. Горбачева, М. П. Козиев // *Сибирский медицинский журнал.* – 2006. – № 7. – С. 5-7.

335. Коваль Т. В. Зміна вмісту глутатіону в тимоцитах щурів за індукції апоптозу під впливом H_2O_2 або радіації / Т. В. Коваль, О. О. Назарова, О. П. Матишевська // *Укр. біохім. журн.* – 2008. – Т. 80, № 2. – С. 114-119.

336. Гребинный Д. М. Кальциевый гомеостаз в тимоцитах при апоптозе. I. Повышение концентрации цитозольного Ca^{2+} на ранней стадии апоптоза, индуцированного пероксидом водорода / Д. М. Гребинный, Т. В. Коваль, О. П. Матишевська // *Укр. біохім. журн.* – 2004. – Т. 76, № 6. – С. 63-69.

337. Capodicasa E. Effect of lansoprazole on human leukocyte function / E. Capodicasa, F. De Bellis, M. A. Pelli // *Immunopharmacol Immunotoxicol.* – 1999. – Vol. 21. – P. 357-377.

338. Omeprazole treatment diminishes intra- and extracellular neutrophil reactive oxygen production and bactericidal activity / K. Zedtwitz-Liebenstein, C. Wensch, S. Patruta [et al.] // *Crit Care Med.* – 2002. – Vol. 30. – P. 1118-1122.

339. Mantovani A. Cancer: Inflaming metastasis / A. Mantovani // *Nature.* – 2009. – Vol. 457. – P. 36-37.

340. Gastric inflammation, metaplasia, and tumor development in gastrin-deficient mice / L. Friis-Hansen, K. Rieneck, HO. Nilsson [et al.] // *Gastroenterology.* – 2006. – Vol. 131. – P. 246-258.

341. Balfour S. R. Probiotic therapy of intestinal inflammation and infections / S.R. Balfour // *Current Opinion in Gastroenterology.* – 2005. – Vol. 21, Issue 1. – P. 44-50.

342. Fedorak R. N., Probiotics and prebiotics in gastrointestinal disorders / R. N. Fedorak, K. L. Madsen // *Current Opinion in Gastroenterology.* – 2004. – Vol. 20, Issue 2. – P. 146-155.

343. Snelling A. M. Effects of probiotics on the gastrointestinal tract / A.M. Snelling // *Current Opinion in Infectious Diseases.* – 2005. – Vol. 18, Issue 5. – P. 420-426.

344. How cells respond to interferons / G. R. Stark, I. M. Kerr, B. R. G. Williams [et al.] // *Annu. Rev. Biochem.* – 1998. – Vol. 67. – P. 227-264.

345. Goodbourn S. Interferons: cell signaling, immune modulation, antiviral responses virus countermeasures / S. Goodbourn, L. Didcock, R. E. Randall // *J. Gen. Virol.* – 2000. – Vol. 81. – P. 2341-2364.