

## СТРЕС-РЕСПОНСИВНІ СИСТЕМИ ПІДШЛУНКОВОЇ ЗАЛОЗИ ЩУРІВ В УМОВАХ ТРИВАЛОЇ ШЛУНКОВОЇ ГІПОХЛОРГІДРІЇ ТА ЗА ВВЕДЕННЯ МУЛЬТИПРОБІОТИКА «СИМБІТЕР®»

К. О. ДВОРЩЕНКО, С. Є. ВАКАЛ, А. С. ДРАНИЦИНА,  
С. А. СЕНІН, Л. І. ОСТАПЧЕНКО

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Україна;  
e-mail: k21037@gmail.com

На моделі тривалого гіпоацидного стану, спричиненого омепразолом, досліджено інтенсивність вільнорадикальних процесів у підшлунковій залозі щурів. Встановлено істотне порушення окисно-антиоксидантної рівноваги у тканині підшлункової залози за шлункової гіпохлоргідрії: надлишкове утворення супероксидного аніон-радикала, кількісні зміни функціональних груп ліпідів, зростання вмісту продуктів пероксидного окислення ліпідів, збільшення ксантиноксидазної, супероксиддисмутазної та глутатіонтрансферазної активності, зниження каталазної і глутатіонпероксидазної активності та вмісту відновленого глутатіону. За гіпоацидних умов у шлунку щурів в підшлунковій залозі змінюється експресія гену *Scckbr*, що підвищує ризик розвитку патологічних змін у досліджуваному органі. Виявлено, що в умовах введення мультипробіотика «Симбітер®» щурам з гіпоацидним станом у шлунку вищезазначені показники частково відновлюються до контрольних значень, що свідчить про здатність препарату ефективно протидіяти розвитку окисних пошкоджень тканини підшлункової залози у разі тривалого гіпоацидного стану шлунка.

**Ключові слова:** гіпохлоргідрія, підшлункова залоза, супероксидний аніон-радикал, пероксидне окислення ліпідів, антиоксидантна система, експресія генів, пробіотики.

Процеси вільнорадикального окислення, які постійно відбуваються в живих організмах, є складовою ланкою метаболічної активності клітин. Основним механізмом активації вільнорадикальних процесів є збільшення утворення активних форм кисню (АФК). Висока реакційна здатність та малі значення часу життя в біологічних системах роблять АФК ефективним інструментом локальної дії. Фізіологічними ефектами АФК є цитотоксична дія фагоцитів, регуляція клітинної проліферації та тону судин, індукція транскрипції окремих генів. АФК виконують регуляторну функцію: стимулюють акумуляцію в клітині вторинних месенджерів (цАМФ, цГМФ), спричинюють накопичення іонів Са в цитозолі та стимуляцію фосфорильовання протеїнів [1, 2]. В той самий час АФК можуть виявляти і виразну токсичну дію на структури клітин. Їх пошкоджуюча дія в багатьох випадках обумовлена подальшою стимуляцією процесів вільнорадикального окислення, що призводить до розвитку окисного стресу, який виявляється накопиченням токсичних продуктів, ушкодженням мембран клітин, тканин, органів та організму в цілому.

Обмеження негативної дії вільних радикалів забезпечується активацією та мобілізацією антиоксидантної системи. Баланс між утворенням вільних радикалів та їх своєчасним знешкодженням антиоксидантною системою забезпечує функціонування організму в межах фізіологічної норми [3, 4]. Таким чином, порушення окисно-антиоксидантної рівноваги може слугувати одним із чутливих біомаркерів розвитку стресових реакцій в організмі.

Превалювання вільнорадикальних процесів над системою антиоксидантного захисту є важливою патогенетичною ланкою у виникненні та розвитку широкого кола захворювань. Зокрема, існує тісний зв'язок між розвитком захворювань підшлункової залози та активацією вільнорадикальних процесів. Встановлено, що розвиток панкреатиту та раку підшлункової залози може бути асоційований зі зниженою кислотністю шлункового соку [5–7].

Для корекції структурно-функціональних порушень у шлунково-кишковому тракті (ШКТ) застосовують пробіотичні препарати, які виконують важливу роль у підтриманні загального гомеостазу організму за рахунок

оптимізації його мікроекологічного статусу. Серед пробіотиків потенційно ефективнішими порівняно з монокомпонентними препаратами є мультипробіотики, які складаються з комбінації різних бактеріальних штамів. Для проведення досліджень нами було обрано мультипробіотик «Симбітер® ацидофільний», який є біомасою – симбіозом живих клітин молочнокислих, пропіоновокислих і біфідобактерій [8].

Метою роботи було визначити інтенсивність вільнорадикальних процесів та функціональний стан ензиматичної антиоксидантної системи в підшлунковій залозі щурів в умовах тривалого гіпоацидного стану шлунка та за введення мультипробіотика «Симбітер®».

### Матеріали і методи

Дослідження проводили на білих нелінійних статевозрілих щурах-самцях з масою тіла 180–220 г із дотриманням загальних етичних принципів експериментів на тваринах, ухвалених Першим національним конгресом України з біоетики (вересень 2001 року), інших міжнародних угод та національного законодавства в цій галузі. Всіх тварин, яких було використано в досліді, утримували в стандартних клітках. Воду та збалансований гранульований корм тварини отримували *ad libitum*. Усіх тварин було розділено на чотири експериментальні групи. У першій групі (контроль) щурам протягом 28 діб вводили внутрішньочеревно 0,2 мл та перорально 0,5 мл води для ін'єкцій. Тваринам другої групи протягом 28 діб вводили мультипробіотик «Симбітер® ацидофільний» концентрований (ТОВ О.Д. Пролісок) перорально в дозі 0,14 мл/кг, розчинений у 0,5 мл води для ін'єкцій. У третій групі щурів гіпоацидний стан моделювали за допомогою внутрішньочеревного введення 14 мг/кг омепразолу (Sigma, США) 1 раз на добу протягом 28 діб. Четверта група щурів одночасно із введенням омепразолу отримувала мультипробіотик «Симбітер®» перорально в дозі 0,14 мл/кг, розчинений в 0,5 мл води для ін'єкцій.

Омепразол належить до класу препаратів – інгібіторів протонної помпи (ІПП) парієтальних клітин шлунка. За структурою – це заміщене похідне бензімідазолу, яке має властивості слабкої основи із значенням  $pK_a \approx 4,0$ . За рахунок високої ліпофільності омепразол всмоктується у проксимальних ділянках ШКТ, транспортується кров'ю в альбумінзв'язаному стані та вільно проникає

крізь клітинні мембрани. Досягаючи секреторних каналців парієтальних клітин шлунка, омепразол двічі протонується, внаслідок чого утворюється активна форма молекули – сульфенамід омепразолу. Протонувана форма значно гірше проникає крізь клітинні мембрани, за рахунок чого концентрація омепразолу саме в секреторних каналцях парієтальних клітин приблизно в 1000 разів перевищує його концентрацію в крові [9, 10].

Сульфенамід омепразолу діє як тіофільний агент, формуючи дисульфідні містки із 321, 813 та 822 залишками цистеїну  $H^+/K^+$ -АТРази, що призводить до необоротного інгібування ензиму та зниження секреції протонів у просвіт секреторних каналців [10]. Виходячи з того, що омепразол не накопичується в клітинах підшлункової залози (подібні дані відсутні в літературі), можливість прямого індукування окисного стресу омепразолом можна виключити.

З експерименту тварин виводили шляхом декапітації під тіопенталовим наркозом (8 мг/кг маси тіла). Для досліджень підшлункову залозу тварин одразу поміщали у скраплений азот.

Вміст супероксидного аніон-радикала визначали спектрофотометрично з використанням ХТТ (2,3-біс-(2-метокси-4-нітро-5-сульфофеніл)-2Н-тетразолій-5-карбоксамід) як акцептора електронів [11]. Активність ксантиноксидази (1.2.3.2) визначали за утворенням сечової кислоти із ксантину [12].

Екстракцію ліпідів із підшлункової залози щурів проводили за методом Folch [13] хлороформ – метанольною сумішшю (2 : 1, за об'ємом). Одержані екстракти очищали від неліпідних домішок методом Кейтса [14]. Кількість загальних ліпідів у тканині підшлункової залози визначали шляхом зважування сухого залишку їх після видалення розчинника на роторному випарювачі. З одержаних сумарних ліпідів знімали спектри на Фур'є-спектрометрі «Nexus» (Thermo Nicolet, США), обладнаним датчиком DTGS. Аналіз отриманих ІЧ-спектрів ліпідів здійснювали в діапазоні хвильових чисел від 4000 до 400  $cm^{-1}$ . Вимірювання площ піків на ІЧ-спектрах проводили за допомогою програмного забезпечення приладу OMNIC (версія 5.1). Кількісну оцінку функціональних груп ліпідів виражали в умовних одиницях на мг ліпідів [15].

Вміст дієнових кон'югатів визначали в гептан-ізопропанольному екстракті спектрофотометричним методом [16], а вміст ТБК-активних продуктів – за реакцією з тіобарбітуровою кислотою [17]. Активність супероксиддисмутази (СОД, 1.15.1.1) встанов-

лювали за ступенем зниження відновлення нітросинього тетразолію в присутності NADH, феназинметасульфату – за методом [18], активність каталази (1.11.1.6) – за швидкістю розкладання пероксиду водню [19], активність глутатіонпероксидази (1.11.1.9) – за накопиченням окисленого глутатіону [20], активність глутатіонтрансферази (2.5.1.18) – за утворенням адуктів 1-хлоро-2,4-динітробензолу із глутатіоном [20]. Вміст загального глутатіону (GSH) у непротеїновому фільтраті тканини визначали ензимним методом із реактивом Еллмана (ДТНБ) [21], вміст протеїну – методом Лоурі [22].

РНК отримували за методом Chomczynski [23]; кДНК синтезували в 20 мкл реакційної суміші, яка містила 2 мкг РНК, 1 мМ дНТФ, 200 од. зворотної транскриптази RevertAid M-MLV, відповідний буфер, 20 од. рибонуклеазного інгібітора (RiboLock), 1 мкМ зворотного праймера. Синтез проводили за таких умов: 70 °С – 5 хв, далі 37 °С – 5 хв, 42 °С – 1 год. Полімеразна ланцюгова реакція відбувалася в 30 мкл реакційної суміші, що містила 10 мкл кДНК, буфер для ПЛР, по 200 мкМ кожного dNTP, по 1 мкМ кожного праймера, до 2,5 мМ MgCl<sub>2</sub> та 1,5 од. Taq ДНК полімерази (МВІ Fermentas, Литва). Ампліфікацію фрагментів ДНК проводили за таких температурних умов: ініціююча денатурація 94 °С – 4 хв; далі 35 циклів (30 циклів – для β-актину (ген, що використовується для внутрішнього контролю реакції завдяки конститутивній експресії)); денатурація ДНК 94 °С – 45 с; гібридизація праймерів 59 °С – 45 с для Cckbr (184 п.н.) та 49 °С – 40 с для β-актину (521 п.н.); добування ланцюга 72 °С – 1 хв 15 с (для Cckbr) або 1 хв (для β-актину). Після цього проводили добування ампліфікатів при 72 °С – 5 хв.

У реакціях використовували такі послідовності праймерів: для Cckbr – пря-

мий GCAAGCACGAGTATGGCAAA та зворотний – TAGCACGGACCAGGTTTGTGTT; для β-актину – прямий TGGGACGATATGGAGAAGAT та зворотний ATTGCCGATAGTGATGAXCT. Розділення продуктів полімеразної ланцюгової реакції проводили електрофоретично в 1,6%-му агарозному гелі, у 0,5-кратному TBE-буфері, за напруги 5–10 В/см. Для напівкількісного аналізу експресії ампліконів на основі денситометрії було використано програму ImageJ 1.45s (NIH, США). Індокси експресії мРНК визначали для кожного зразка як описано Konturek et al. [24].

Статистичний аналіз проводили з використанням *t*-критерію Стьюдента; вірогідними вважали дані за *P* < 0,05.

### Результати та обговорення

Результати проведених досліджень показали, що в умовах тривалої шлункової гіпохлоргідрії в гомогенаті підшлункової залози вміст супероксидного аніон-радикала збільшується в 1,5 раза відносно контролю (табл. 1).

Супероксидний аніон-радикал відіграє безпосередню роль в ініціації вільнорадикальних процесів. Його генерація є пусковою ланкою каскаду реакцій, які призводять до виникнення АФК. Крім того O<sub>2</sub><sup>-</sup> відновлює Fe<sup>3+</sup> до Fe<sup>2+</sup>, беручи участь у реакції Фентона, яка призводить до утворення реакційного гідроксильного радикала [25]. Механізмами дії АФК на клітину є індукція та подовження ланцюгів вільнорадикального окислення ліпідів, окисна модифікація ДНК, протеїнів. Зростання вмісту супероксидного аніон-радикала в умовах гіпоацидного стану шлунка відбувається за рахунок його утворення в мітохондріальних та мікосомних електронно-транспортних ланцюгах клітин

Таблиця 1. Утворення супероксидного аніон-радикала та ксантиноксидазна активність у підшлунковій залозі щурів в умовах тривалої шлункової гіпохлоргідрії та за введення мультипробіотика «Симбітер®» (*M* ± *m*, *n* = 10)

Параметри	Групи тварин			
	1 – контроль	2 – Симбітер	3 – Омепразол	4 – Омепразол + Симбітер
Вміст ХТТ-формази, мкмоль · мг <sup>-1</sup> протеїну	20,37 ± 1,85	15,28 ± 1,15*	31,24 ± 2,92*	25,93 ± 2,47*/#
Ксантиноксидазна активність, нмоль · хв <sup>-1</sup> · мг <sup>-1</sup> протеїну	7,48 ± 0,69	5,68 ± 0,52*	9,34 ± 0,85*	6,71 ± 0,63*/#

Тут і в табл. 2–3 \* різниця вірогідна порівняно з показниками контрольної групи, *P* < 0,05; # різниця вірогідна порівняно з групою тварин, яким вводили омепразол, *P* < 0,05

підшлункової залози. Крім того, додатковим джерелом супероксиду може бути ксантиноксидаза, яка виявляє свою активність внаслідок окислення SH-груп ксантиндегідрогенази [26].

Встановлено, що ксантиноксидазна активність у підшлунковій залозі щурів в умовах тривалої шлункової гіпохлоргідрії зростає в 1,3 раза відносно таких показників у тварин контрольної групи. Зростання ксантиноксидазної активності є додатковим джерелом утворення вільних радикалів у клітинах підшлункової залози щурів із гіпоацидним станом.

Збільшення вмісту супероксидного аніон-радикала та ксантиноксидазної активності в підшлунковій залозі щурів під час тривалої гіпохлоргідрії шлунка може ініціювати модифікацію мембран внаслідок окислення ліпідного бішару. Тому було доцільним дослідити структурну організацію ліпідів підшлункової залози щурів в умовах нашого експерименту.

Під час аналізу ІЧ-спектрів Фур'є структурних елементів ліпідів підшлункової залози контрольних щурів встановлено переважання метинових, карбонільних, метиленових, гідроксильних і фосфатних груп та *цис*-ізомерів, при цьому вміст альдегідних груп та *транс*-ізомерів був найменшим (рис. 1).

В умовах тривалої шлункової гіпохлоргідрії у підшлунковій залозі щурів збільшується вміст гідроксильних груп у 3,1 раза; альдегідних – у 2,8 раза та *транс*-ізомерів у 2 рази порівняно з контролем (табл. 2). Одночасно знижується вміст метиленових груп – у 2,8 раза, фосфатних – у 2 рази, метинових – в 1,2 раза, карбонільних – в 1,5 раза та *цис*-ізомерів у 2,4 раза відповідно, що свідчить про істотні зміни в структурній організації ліпідів підшлункової залози щурів.

Згідно з одержаними результатами експериментальних досліджень встановлено, що в умовах тривалої гіпоацидності шлункового соку змінюється склад та швидкість окислюваль-

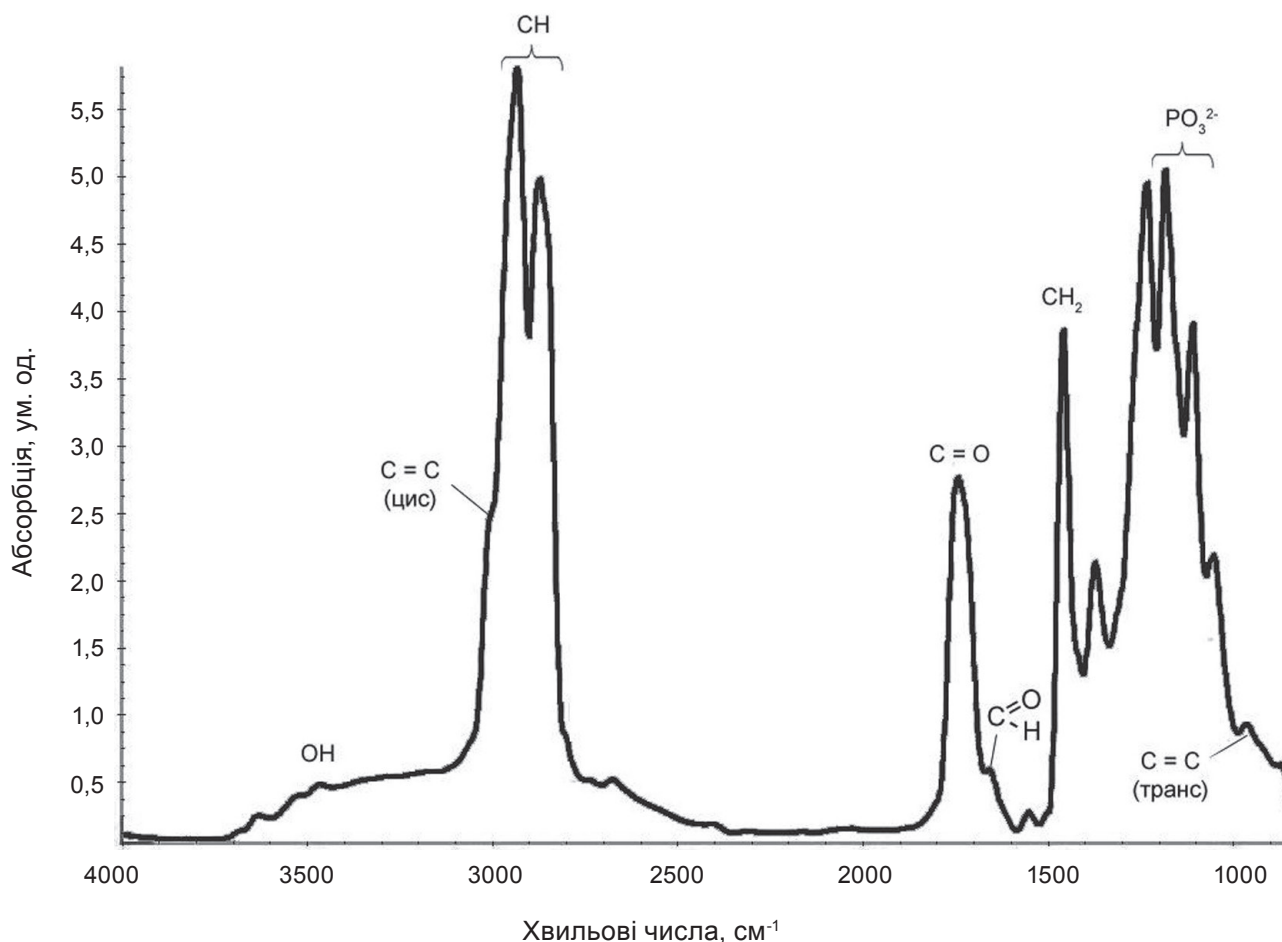


Рис. 1. ІЧ-спектр Фур'є загальних ліпідів підшлункової залози контрольних щурів ( $M \pm m$ ,  $n = 10$ )



Таблиця 2. Вміст функціональних груп ліпідів (ум. од. · мг ліпідів<sup>-1</sup>) у підшлунковій залозі щурів в умовах тривалої шлункової гіпохлоргідрії та за введення мультипробіотика «Симбітер®» ( $M \pm m$ ,  $n = 10$ )

Параметри	Групи тварин			
	1 – контроль	2 – Симбітер	3 – Омепразол	4 – Омепразол + Симбітер
Гідроксильні групи (3600–3100 см <sup>-1</sup> )	0,18 ± 0,01	0,21 ± 0,02	0,56 ± 0,05*	0,34 ± 0,03*#
Цис-ізомери (3010 см <sup>-1</sup> )	0,12 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,08 ± 0,01*#
Метинові групи (2800–2929 см <sup>-1</sup> )	2,41 ± 0,12	2,35 ± 0,11	1,94 ± 0,08*	2,16 ± 0,11
Карбонільні групи (1720 см <sup>-1</sup> )	1,56 ± 0,14	1,49 ± 0,12	1,07 ± 0,09*	1,37 ± 0,12
Альдегідні групи (1679 см <sup>-1</sup> )	0,04 ± 0,00	0,05 ± 0,01	0,11 ± 0,01*	0,07 ± 0,01*#
Метиленові групи (1454 см <sup>-1</sup> )	0,58 ± 0,05	0,51 ± 0,05	0,21 ± 0,02*	0,36 ± 0,03
Фосфатні групи (1210 см <sup>-1</sup> )	0,08 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,04 ± 0,00*	0,06 ± 0,01*#
Транс-ізомери (968 см <sup>-1</sup> )	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,04 ± 0,00*	0,03 ± 0,00#

них процесів у ліпідах мембран підшлункової залози щурів. Зафіксоване зниження вмісту метиленових, фосфатних, карбонільних та метинових груп може свідчити про структурні зміни у фосфоліпідах мембран панкреоцитів. Встановлене зростання в підшлунковій залозі щурів кількості гідроксильних і альдегідних груп на фоні зниження *цис*-ізомерів та збільшення *транс*-ізомерів свідчить про активацію процесів пероксидного окислення ліпідів (ПОЛ), оскільки саме подвійні зв'язки *цис*-ізомерів поліненасичених жирних кислот є головною мішенню вільних радикалів.

Одержані результати досліджень щодо змін структурної організації ліпідів підшлункової залози щурів в умовах тривалої шлункової гіпохлоргідрії пов'язані з порушенням окисно-антиоксидантної рівноваги в досліджуваному органі. Так, встановлено, що в умовах тривалої шлункової гіпохлоргідрії вміст продуктів ПОЛ: дієнових кон'югатів та ТБК-активних сполук зростає у 3 рази відносно контролю (табл. 3). Збільшення вмісту дієнових кон'югатів свідчить про утворення спряжених систем внаслідок міграції подвійних зв'язків жирних кислот після утворення пероксидної групи, що відбувається на стадії подовження ланцюгів окислення. У нативних жирних кислотах подвійні зв'язки неспряжені, а розділяються декількома одинарними зв'язками. Основна частка серед тіобарбітурореактивних сполук належить малоновому діальдегіду, який є хімічно активним і дуже токсичним. Його альдегідні групи утворюють міжмолекулярні зшивки із протеїнами та нуклеїновими кис-

лотами, що супроводжується порушенням структури макромолекул та дезорганізацією їх функціонування. Крім того, можуть виникати структурно-функціональні зміни біомембран, зокрема збільшення їхньої проникності для іонів кальцію, який у надмірній кількості може спричинити клітинні пошкодження [27].

Виявлена активація процесів ПОЛ у тканинах підшлункової залози в умовах тривалого гіпоацидного стану шлунка може бути пов'язана з порушенням роботи антиоксидантної системи. Встановлено, що за тривалої шлункової гіпохлоргідрії у підшлунковій залозі супероксиддисмутазна активність зростає в 1,9 раза, а каталазна – знижується в 1,3 раза відносно контролю (табл. 3).

Активація СОД в підшлунковій залозі в умовах тривалої шлункової гіпоацидності може бути пов'язана з підвищенням вмісту супероксидного аніон-радикала, який є субстратом цього ензиму. З іншого боку, в умовах окисного стресу та під впливом прозапальних цитокінів у панкреоцитах можуть активуватись транскрипційні фактори NF-κB і AP-1, які стимулюють експресію ізоформ СОД [28]. Внаслідок інтенсивнішої дисмутації супероксиду під впливом СОД у підшлунковій залозі вірогідно істотно зростає рівень гідропероксиду, надлишковий вміст якого може призводити до інгібування каталази внаслідок окислення редоксчутливих радикалів амінокислот в її активному центрі [29, 30].

При дослідженні глутатіонової ланки антиоксидантної системи в умовах тривалої гіпоацидності в шлунку в тканині підшлункової

Таблиця 3. Вміст продуктів пероксидного окислення ліпідів та активність ензимів антиоксидантного захисту в підшлунковій залозі щурів в умовах тривалої шлункової гіпохлоргідрії та за введення мультипробіотика «Симбітер®» ( $M \pm m, n = 10$ )

Параметри	Групи тварин			
	1 – контроль	2 – Симбітер	3 – Омепразол	4 – Омепразол + Симбітер
Дієнові кон'югати, нмоль · мг <sup>-1</sup> протеїну	391,12 ± 23,98	411,59 ± 27,13	1155,11 ± 65,83*	456,51 ± 24,27*/#
ТБК-активні продукти, нмоль · мг <sup>-1</sup> протеїну	94,42 ± 7,54	77,73 ± 6,14*	278,47 ± 19,34*	172,91 ± 16,16*/#
Супероксиддисмуазна активність, ум. од. · хв <sup>-1</sup> · мг <sup>-1</sup> протеїну	0,34 ± 0,03	0,33 ± 0,03	0,65 ± 0,04*	0,28 ± 0,02*/#
Каталазна активність, нмоль · хв <sup>-1</sup> · мг <sup>-1</sup> протеїну	5,54 ± 0,32	5,97 ± 0,26	4,33 ± 0,39*	6,09 ± 0,41#
Глутатіонпероксидазна активність, мкмоль GSSG · хв <sup>-1</sup> · мг <sup>-1</sup> протеїну	0,13 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,08 ± 0,01*	0,11 ± 0,01*/#
Глутатіонтрансферазна активність, мкмоль · хв <sup>-1</sup> · мг <sup>-1</sup> протеїну	0,13 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,24 ± 0,02*	0,15 ± 0,01#
Відновлений глутатіон, нмоль · мг <sup>-1</sup> протеїну	2,18 ± 0,19	2,94 ± 0,27*	0,96 ± 0,09*	1,58 ± 0,14*/#

залози встановлено, що глутатіонпероксидазна активність та вміст відновленого глутатіону знижуються в 1,6 та 2,3 рази відповідно, при цьому зростає глутатіонтрансферазна активність у 1,8 рази відносно контролю (табл. 3). Зниження сумарної глутатіонпероксидазної активності разом з інактивацією каталази вірогідно свідчить про загальне послаблення антипероксидної лінії захисту клітин підшлункової залози щурів під час тривалої шлункової гіпохлоргідрії. Підвищення глутатіонтрансферазної активності за цих самих умов може бути наслідком посиленої експресії гену цього ензиму. Відомо, що стресовий фактор NF-κB є позитивним регулятором експресії глутатіонтрансферази. Крім того, зростання активності цього ензиму може свідчити про активацію процесів S-глутатіонування протеїнів, що здійснює протекторну роль та редокс-регуляцію функції протеїнів-мішеней в умовах окисного стресу [31, 32]. Падіння рівня відновленого глутатіону, який є субстратом функціонування глутатіонзалежної системи на фізіологічному рівні, свідчить про зниження тіолового редокс-потенціалу в клітинах підшлункової залози щурів з тривалим гіпоацидним станом у шлунку.

Одержані в наших дослідженнях результати дозволяють дійти висновку, що за тривалої гіпоацидності шлункового соку в тканині підшлункової залози порушується окисно-антиоксидантний баланс за рахунок надлишкового утворення АФК, зокрема супероксидного аніон-радикала, та зниження ефективності функціонування ензимів антиоксидантної системи. Наслідком активації вільнорадикальних процесів є накопичення в панкреоцитах продуктів ПОЛ, які здатні спричинити їх структурно-функціональні пошкодження. Таким чином, окисний стрес є одним з патогенетичних факторів, що призводить до розвитку деструктивних змін і функціональних розладів у підшлунковій залозі в умовах тривалої гіпоацидності шлунка.

З хімічної точки зору, окисний стрес — це значне збільшення редокс-статусу клітин, який впливає на регуляцію генної експресії, клітинної сигналізації та всіх інших біологічних процесів, включаючи вирішення проблеми життя та загибелі клітини. Встановлено, що надмірна експресія гастринового рецептора (CCK<sub>B</sub>R) асоційована з низкою патологій підшлункової залози, зокрема з гострим панкреатитом та аденокарциномою проток органа

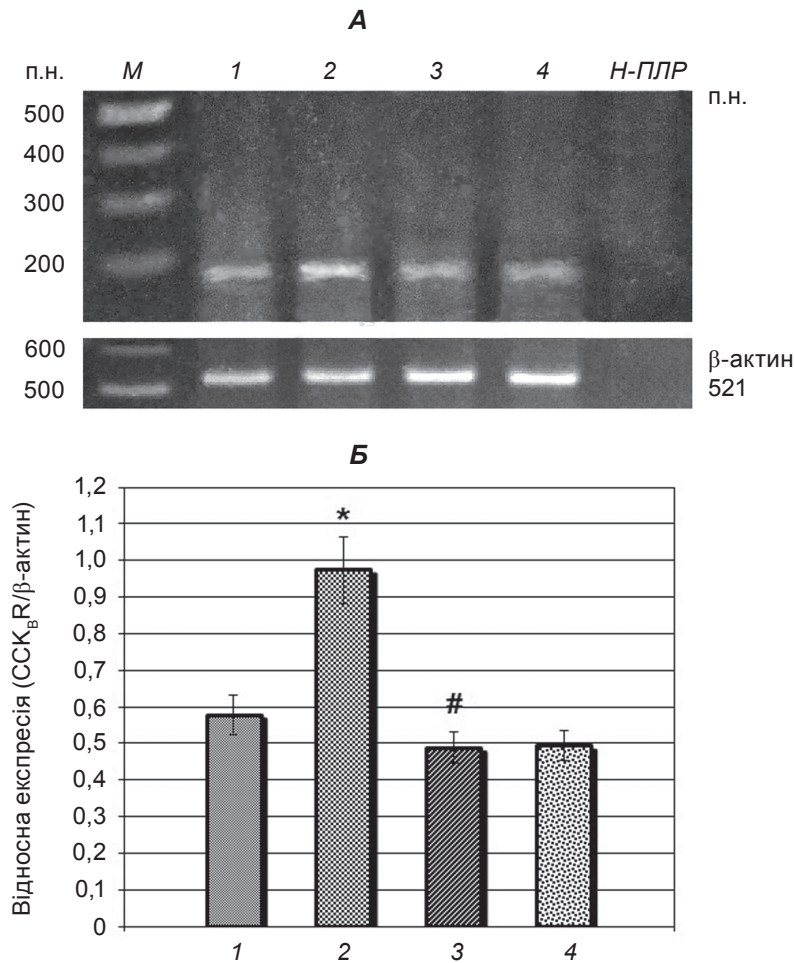


Рис. 2. Рівень експресії мРНК гену *Cckbr* у підшлунковій залозі щурів в умовах тривалої шлункової гіпохлоргідрії та за введення мультипробіотика Симбітер: А – електрофореграма розділення продуктів ПЛР; Б – відносна експресія гену *Cckbr*. М – маркер молекулярної маси; 1 – контроль; 2 – омепразол; 3 – омепразол + Симбітер; 4 – Симбітер; Н-ПЛР – негативний контроль ПЛР. \* Різниця вірогідна порівняно з контрольною групою,  $P < 0,05$ ; # Різниця вірогідна порівняно з групою тварин, яким вводили омепразол,  $P < 0,05$

[33–35]. Проведені нами дослідження експресії гену *Cckbr* у підшлунковій залозі щурів в умовах тривалої гіпоацидності шлунка виявили, що в контрольній групі рівень мРНК гену *Cckbr* становить  $0,578 \pm 0,054$  відносно β-актину (рис. 2). У тварин, яким вводили омепразол, цей показник зростає в 1,7 раза відносно контролю.

Встановлене нами підвищення рівня мРНК гену *Cckbr* за гіпоацидних умов, з одного боку, може бути пов'язане лише з посиленням експресії цього гену ендокринними клітинами підшлункової залози, а з іншого – з початком експресії в клітинах екзокринної частини цього органа [36]. Це підтверджується даними літератури, згідно з якими експресія гастринового рецептора (ССК<sub>B</sub>R) в нормі в підшлунковій залозі властива ендокринним

клітинам типу α або δ (як у людини, так і в щурів) [33, 34, 37]. Окрім того, є дані про низький рівень експресії гену *Cckbr* в ацинарних клітинах підшлункової залози в нормі [34, 37], в той час як експресію цього субтипу рецептора в клітинах проток залози досі не показано. Надмірна експресія ССК<sub>B</sub>R може бути асоційована з розвитком гострого панкреатиту [33, 34, 38]. Одержані також дані про зв'язок експресії ССК<sub>B</sub>R в ацинарних клітинах та карциномою цього клітинного типу і аденокарциномою протока підшлункової залози [35]. Отже, стан тривалої гіпоацидності супроводжується зміною характеру експресії гену *Cckbr* у підшлунковій залозі щурів.

Результати проведених досліджень свідчать, що в умовах тривалого зниження шлункової секреції гідрохлоридної кислоти

омепразолом, у підшлунковій залозі щурів відбувається порушення окислювального гомеостазу, що супроводжується акумуляцією супероксидного аніон-радикала, кількісними змінами функціональних груп ліпідів, накопиченням продуктів пероксидного окислення ліпідів та зниженням ефективності роботи ензимів антиоксидантної системи. У відповідь на біохімічні стимули, які виникають за гіпоацидних умов, у підшлунковій залозі змінюється експресія гену *Cckbr*, що підвищує ризик розвитку патологічних порушень.

В умовах нашого експерименту введення мультипробіотика «Симбітер®» щурам із тривалою шлунковою гіпохлоргідрією сприяє нормалізації досліджуваних біохімічних параметрів у тканині підшлункової залози: знижується вміст супероксидного аніон-радикала та ксантиноксидазна активність в 1,2 та 1,4 рази відповідно порівняно з групою тварин із гіпоацидним станом (табл. 1). За сумісного введення тваринам мультипробіотика «Симбітер®» та омепразолу спостерігається суттєве відновлення структурної організації ліпідів підшлункової залози: знижується рівень гідроксильних груп – в 1,7 рази, альдегідних – в 1,6 рази, і *транс*-ізомерів – 1,3 рази, при цьому зростає вміст метиленових груп – в 1,7 рази, карбонільних – 1,3 рази, фосфатних – 1,5 рази і *цис*-ізомерів – 1,6 рази відносно групи щурів, яким вводили омепразол (табл. 2).

За введення мультипробіотика «Симбітер®» щурам з гіпоацидним станом вміст продуктів ПОЛ знижується: дієнових кон'югатів – у 2,5 рази та ТБК-активних сполук – 1,6 рази порівняно з такими показниками у тварин, яким вводили лише омепразол (табл. 3). За сумісного введення омепразолу та мультипробіотика «Симбітер®» відновлюються показники антиоксидантного захисту клітин підшлункової залози: знижується супероксиддисмутазна та глутатіонтрансферазна активність в 2,3 та 1,6 рази відповідно, зростає каталазна та глутатіонпероксидазна активність – в 1,4 рази, збільшується вміст відновленого глутатіону – в 1,7 рази відносно до групи тварин з гіпоацидним станом (табл. 3).

За одночасного введення мультипробіотика «Симбітер®» та омепразолу рівень мРНК гену *Cckbr* знижується в 2 рази порівняно з таким показником в групі тварин з гіпоацидним станом та є подібним до контролю (рис. 2).

Такий корегуючий ефект мультипробіотика на досліджувані біохімічні параметри підшлункової залози щурів в умовах розвитку омепразоліндукованого гіпоацидного стану пов'язаний з широким спектром його фізіологічної активності, зокрема протимікробними, антиоксидантними та імунomodуючими властивостями [39]. Так, мультипробіотик «Симбітер®» здатний усувати колонізацію ШКТ патогенними бактеріями та дисбактеріоз, який виникає в умовах зниженого рівня гідрохлоридної кислоти у шлунковому соку [39]. Це, в свою чергу, знімає зі ШКТ та асоційованих органів навантаження з боку патогенної мікрофлори. Показано, що бактерії роду *Lactobacillus*, які входять до складу мультипробіотика «Симбітер®», за рахунок синтезу Mn-SOD здатні знижувати інтенсивність запальних процесів у кишечнику [40]. Дослідженнями групи Lutgendorff et al. [41] показано, що мультикомпонентні пробіотики здатні посилювати *de novo* синтез основного низькомолекулярного антиоксиданту клітини – глутатіону – і, таким чином, підвищувати його вміст як у цілому ШКТ, так і конкретно в підшлунковій залозі. Відомо, що окремі штами бактерій у складі мультипробіотика «Симбітер®» здатні синтезувати вітаміни групи В, в тому числі кобаламіни, екзополісахариди та коротколанцюгові жирні кислоти, які виявляють мембраностабілізуючі та антиоксидантні властивості [8].

Таким чином, за гіпоацидних умов у шлунку щурів мультипробіотик «Симбітер®» знижує інтенсивність вільнорадикальних процесів у підшлунковій залозі за рахунок збільшення активності ензимів антиоксидантної системи, гальмування надмірної генерації АФК і продуктів ПОЛ, відновлення вмісту функціональних груп ліпідів та нормалізації експресії генів, задіяних у розвитку захворювань, що забезпечує протекцію підшлункової залози від окисних пошкоджень.



**СТРЕСС-РЕСПОНСИВНЫЕ СИСТЕМЫ  
В ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЕ  
КРЫС НА ФОНЕ ДЛИТЕЛЬНОЙ  
ЖЕЛУДОЧНОЙ ГИПОХЛОРИДИИ  
И ПРИ ВВЕДЕНИИ  
МУЛЬТИПРОБИОТИКА  
«СИМБИТЕР®»**

*Е. А. Дворщенко, С. Е. Вакал,  
А. С. Драницина, С. А. Сенин,  
Л. И. Остапченко*

Киевский национальный университет  
имени Тараса Шевченко, Украина;  
e-mail: k21037@gmail.com

На модели длительного гипоацидного состояния желудка, вызванного омепразолом, исследовали интенсивность свободнорадикальных процессов в поджелудочной железе крыс. Установлено значительное нарушение окислительно-антиоксидантного равновесия в ткани поджелудочной железы при желудочной гипохлоридрии: избыточное образование супероксидного анион-радикала, количественные изменения функциональных групп липидов, увеличение содержания продуктов пероксидного окисления липидов, возрастание ксантиноксидазной, супероксиддисмутазной и глутатионтрансферазной активности, снижение каталазной и глутатионпероксидазной активности и содержания восстановленного глутатиона. При гипоацидных условиях в желудке крыс изменяется экспрессия гена *Cckbr* в поджелудочной железе, в результате чего увеличивается риск развития патологических изменений в исследуемом органе. Установлено, что при введении мультипробиотика «Симбитер®» крысам с гипоацидным состоянием желудка вышеуказанные показатели частично восстанавливаются до контрольных значений, что свидетельствует о способности препарата эффективно противостоять развитию окислительных повреждений ткани поджелудочной железы при длительных гипоацидных состояниях желудка.

**Ключевые слова:** гипохлоридрия, поджелудочная железа, супероксидный анион-радикал, пероксидное окисление липидов, антиоксидантная система, экспрессия генов, пробиотики.

**STRESS-RESPONSIVE SYSTEMS IN  
RAT PANCREAS UPON LONG-TERM  
GASTRIC HYPOCHLORHYDRIA  
AND ADMINISTRATION OF  
MULTIPROBIOTIC «SYMBITER®»**

*K. O. Dvorshchenko, S. Ye. Vakal,  
A. S. Dranitsina, S. A. Senin,  
L. I. Ostapchenko*

Taras Shevchenko National  
University of Kyiv, Ukraine;  
e-mail: k21037@gmail.com

The intensity of free-radical processes upon long-term omeprazole-induced hypoacidity in the rat pancreas was investigated. Significant violation of oxidative-antioxidative balance in pancreatic tissue upon gastric hypochlorhydria was established: overproduction of superoxide anion, quantitative changes of lipid functional groups, increased level of lipid peroxidation products, augmentation of xanthine oxidase, superoxide dismutase and glutathione transferase activity, as well as depletion of catalase, glutathione peroxidase activity and reduced glutathione content. The inflected expression of *Cckbr* gene in the rat pancreas upon these conditions was also observed, thus suggesting an increased risk of pathological changes development in the gland. Abovementioned parameters were only partially restored to control values in the case of simultaneous administration of multiprobiotic «Symbiter®» with omeprazole, thus indicating the ability of this preparation to efficiently counteract the development of oxidative damages in pancreatic tissues upon long-term hypoacidic conditions.

**Key words:** hypochlorhydria, pancreas, superoxide anion, lipid peroxidation, antioxidant system, gene expression, probiotics.

1. *Finkel T.* // J. Cell Biol. — 2011. — **194**. — P. 7–15.
2. *Wolin M. S.* // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. — 2009. — **296**. — P. H539–H549.
3. *Dalle-Donne I., Rossi R., Colombo R. et al.* // Clin. Chem. — 2006. — **52**, N 4. — P. 601–623.
4. *Kim Y. J., Kim E. H., Hahm K. B.* // J. Gastroenterol. Hepatol. — 2012. — **27**, N 6. — P. 1004–1010.
5. *Eland I., Huerta Alvarez C., Stricker B., Garcia Rodriguez* // British J. Clin. Pharmacol. — 2000. — **49**, N 5. — P. 473–478.

6. Morton M., Prendergast C., Barrett T. // Trends Pharmacol. Sci. – 2011. – **32**, N 4. – P. 201–205.
7. Sundstrom A., Blomgren K., Alfredsson L., Wiholm B. E. // Pharmacoepidemiol. Drug Saf. – 2006. – **15**, N 3. – P. 141–149.
8. Янковский Д. С., Дымент Г. С. // Здоровье женщины. – 2006. – **3**, № 27. – С. 181–188.
9. Modlin I., Sachs G. // Schnetztor-Verlag Gmbh, Konstanz. – 1998. – P. 126–142.
10. Shin J., Vagin O., Munson K. et al. // Cell. Mol. Life Sci. – 2008. – **65**, N 2. – P. 264–281.
11. Sutherland M. W., Learmonth B. A. // Free Radic. Res. – 1997. – **27**, N 3. – P. 283–289.
12. Hashimoto S. // Anal. Biochem. – 1974. – **62**, N 2. – P. 426–435.
13. Folch J., Lees M., Stanley G. H. S. // J. Biol. Chem. – 1957. – **226**, N 1. – P. 497–509.
14. Кеймс М. Техника липидологии. – М.: Мир, 1975. – 322 с.
15. Lamba O. P., Borchman D., O'Brien P. J. // Biochemistry. – 1994. – **33**, N 7. – P. 1704–1712.
16. Гаврилов В. Б., Гаврилова А. Р., Хмара Н. Ф. // Лаб. дело. – 1988. – № 2. – С. 60–63.
17. Стальная И. Д., Гаришвили Т. Г. / Современные методы в биохимии. / Под ред. В. Н. Ореховича. – М.: Медицина, 1977. – С. 66–68.
18. Чевари С., Чаба И., Секей Й. // Лаб. дело. – 1985. – № 11. – С. 678–681.
19. Королюк М. А., Ивановна Л. И., Майорова И. Г., Токарев В. Е. // Там же. – 1988. – № 1. – С. 16–18.
20. Власова С. Н., Шабунина Е. И., Пересленина И. А. // Там же. – 1990. – № 8. – С. 19–22.
21. Kannan R., Tang D., Mackic J. et al. // Exp. Eye. Res. – 1993. – **56**, N 1. – P. 45–50.
22. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randal R. I. // J. Biol. Chem. – 1951. – **193**, N 1. – P. 265–275.
23. Chomeczynski P. // Anal. Biochem. – 1987. – **162**, N 1. – P.156–159.
24. Konturek P.C., Brzozowski T., Pierzchalski P. et al. // Aliment. Pharmacol. Ther. – 1998. – **12**, N 8. – P. 767–777.
25. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. – М.: Наука. – 1972. – 252 с.
26. Sakuma S., Kitamura T., Kuroda C. et al. // J. Clin. Biochem. Nutr. – 2012. – **51**, N 1. – P. 55–60.
27. Blair I. A. // J. Biol. Chem. – 2008. – **283**, N 23. – P. 15545–15549.
28. Li X., Stark G. // Exp. Hematol. – 2002. – **30**, N 4. – P. 285–296.
29. DeLuca D. C., Dennis R., Smith W. G. // Arch. Biochem. Biophys. – 1995. – **320**, N 1. – P. 129–134.
30. Vasudevan P., Weiland R. // Biotechnol. Bioeng. – 1990. – **36**, N 9. – P. 783–789.
31. Morceau F., Duvoix A., Delhalle S. et al. // Biochem. Pharmacol. – 2004. – **67**, N 7. – P. 1227–1238.
32. Townsend D. M., Manevich Ye., He L. et al. // J. Biol. Chem. – 2009. – **284**, N 1. – P. 436–445.
33. Cayrol C., Clerc C., Bertrand C. et al. // Oncogene. – 2006. – **27**, N 32. – P. 4421–4428.
34. Morisset J., Laine J., Bierant M., Julien S. // Med. Sci. Monit. – 2004. – **10**, N 10. – P. 242–246.
35. Clerc P., Leung-Theung-Long S., Wang T. et al. // Gastroenterology. – 2002. – **122**, N 2. – P. 428–437.
36. Ashurst H., Varro A., Dimaline R. // Exp. Physiol. – 2007. – **92**, N 2. – P. 223–226.
37. Physiology of the gastrointestinal tract / K. Barrett, F. Ghishan, J. Merchant et al. – Academic Press; 4th edition, 2006. – 2080 p.
38. Morisset J., Calvo E. // J. Physiol. Pharmacol. – 1998. – **49** (Suppl. 2). – P. 25–37.
39. Янковский Д. С., Дымент Г. С. Микрофлора и здоровье человека. – К.: ТОВ «Червона Рута-Турс», 2008. – 552 с.
40. Carroll I. M., Andrus J. M., Bruno-Bárcena J. M. et al. // Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. – 2007. – **293**, N 4. – P. G729–G738.
41. Lutgendorff F., Trullsson L., van Minnen L. et al. // Ibid. – 2008. – **295**, N 5. – P. 1111–1121.

Отримано 21.11.2012