

УДК 616.33-008.821.14+577.151.042+571.27

**ПРОДУКЦІЯ ОКСИДУ АЗОТУ ТИМОЦИТАМИ  
ТА СПЛЕНОЦИТАМИ ЩУРІВ З ТРИВАЛОЮ  
ШЛУНКОВОЮ ГІПОАЦИДНІСТЮ ТА ЗА УМОВ  
ВВЕДЕННЯ МУЛЬТИПРОБІОТИКА  
"СИМБІТЕР® АЦИДОФІЛЬНИЙ"**

**О.Г. Короткий, С.В. Пилипенко, Я.С. Максимович,  
Т.В. Берегова, Л.І. Остапченко**

*Київський національний університет ім. Тараса Шевченка*

**Вступ**

Оксид азоту (NO) - регуляторна молекула, яка синтезується майже всіма імунокomпетентними клітинами та вважається універсальним медіатором в імунній системі [1]. Загальновідомо, що NO відіграє одну з основних ролей у механізмах неспецифічного імунного захисту, забезпечуючи фагоцитоз за участі нейтрофілів і макрофагів та прозапальних цитокінів. ІФН- $\gamma$ , ФНП- $\alpha$  та ІЛ-1 $\beta$  індують синтез NO не лише в макрофагах, а й в інших імунокomпетентних клітинах, в тому числі спленоцитах і тимоцитах [2, 3, 4].

Крім участі у протиінфекційному захисті, NO приймає участь у регуляції певних механізмів розвитку гуморальної та клітинної імунної відповіді за рахунок впливу на Т-хелпер1 / Т-хелпер2 баланс [5], який порушується під час запалення. Залежно від типу та фази запальної реакції NO може відігравати роль як протизапального, так і прозапального фактора [6]. Це пов'язано з тим, що розвиток запалення детермінується генерацією NO, що синтезується індущибельною 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 [7]. Уявлення про подвійну роль NO в розвитку запалення базуються на результатах, отриманих на різних експериментальних моделях, включаючи досліди на тваринах, у яких відсутній кодуєчий ген iNO-синтази [8].

Відомо, що тривале зниження шлункової секреції соляної кислоти призводить до розвитку гіпергастринемії [9] та пору-

шення мікробіоценозу в травному тракті, оскільки кисле середовище є одним з найголовніших неспецифічних факторів захисту проти бактеріальної інфекції [10]. В свою чергу, дисбактеріоз і гіпергастринемія викликають розвиток запальних реакцій в організмі з активним залученням імунної системи. В попередніх наших дослідженнях ми показали, що тривала шлункова гіпоацидність, викликана введенням блокатора протонної помпи - омепразола, спричиняє не лише порушення мікробіоценозу в шлунку та гіпергастринемію, а й підвищення концентрації в сироватці крові прозапальних цитокінів: ІЛ-1 $\beta$ , ФНП- $\alpha$  і ІФН- $\gamma$  [11], які, як вже зазначалось, є одними з основних активаторів продукції NO [2].

Не зважаючи 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® ацидофільний". Тому нами було досліджено NO-синтазну активність та вміст нітрит-іонів у тимоцитах і спленоцитах щурів за вищезгаданих умов.

**Зв'язок роботи з науковими планами, темами.** Робота виконана в рамках науково-дослідної теми "Визначення біохімічних, генетичних, імунологічних та цитологічних маркерів розвитку патологічних станів організму з метою розробки засобів направленої корекції та профілактики" (№ державної реєстрації 0106U005750) Київського національного університету імені Тараса Шевченка як складової комплексної державної наукової програми "Здоров'я людини".

**Матеріали та методи дослідження**

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 згідно міжнародних рекомендацій та національного законодавства про проведення медико-біологічних досліджень [12]. Контролем (І група) слугували щури, яким упродовж 28 діб вводили 0,2 мл внутрішньочеревинно (в/о) та 0,5 мл перорально воду для ін'єкцій. Другій групі щурів перорально вводили мультипробіотик "Симбітер® ацидофіль-

ний" концентрований (СИМ) (виробництва ТОВ "О.Д.Пролісок", Україна) в дозі 0,14 мл/кг, 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 Н<sup>+</sup>-К<sup>+</sup>-АТФази - ключового ферменту синтезу соляної кислоти парієтальними клітинами шлунку. Препарат 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 є живою концентрованою біомасою симбіозу 14 унікальних пробіотичних штамів біфідобактерій, лактобацил, лактококів та пропіоновокислих бактерій та фізіологічно корисних продуктів їх метаболізму. В 10 мл СИМ міститься не менше 10<sup>9</sup> 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, вилучали тимус і селезінку. Клітинну суспензію лімфоцитів з тимуса та селезінки отримували шляхом виділення на градієнті щільності Ficoll-Paque ("Sigma-Aldrich", США) за методом [13]. Життєздатність отриманих лімфоїдних клітин оцінювали за методом [14]. Кількість живих клітин більше 80% вважалась задовільною. В отриманих клітинних суспензіях тимоцитів і спленоцитів визначали спектрофотометрично активність синтази оксиду азоту за методом [15], який полягає у визначенні приросту продуктів аеробного окислення оксиду азоту. Вміст нітрит-іонів вивчали за методом Гріса з модифікаціями, як рекомендовано [16].

Статистичну обробку результатів досліджень з використанням критерію Стюдента для оцінки достовірності проводили за допомогою програми Statistica 7.0. Відмінності вважали достовірними при  $p \leq 0,05$ .

#### Отримані результати та їх обговорення

Відомо, що в імунних клітинах NO виконує регуляторні та сигналтрансдукуючі функції переважно шляхом ковалентної модифікації сірки цистеїну білків з утворенням S-нітрозотіолів. NO активно приймає участь у процесах проліферації, диференціації, апоптозу макрофагів, тимоцитів, лімфоцитів,

ендотеліальних клітин і взаємодії між імунними та іншими клітинами [17]. Відомо також, що NO є важливим фізіологічним регулятором функцій Т-клітин [18].

NO і ONOO<sup>-</sup>, які утворюються при активації індукцибельної ланки синтезу NO, можуть взаємодіяти з багатьма білками та ферментами, які є важливими для передачі сигналів і життєдіяльності клітин. Крім того, показано, що NO і S-нітрозоглутатіон відіграють важливу роль в індукції апоптозу тимоцитів, пов'язаного з негативною селекцією тимоцитів, які експресують Т-клітинні рецептори з високою афінністю до власних пептидів [19, 20].

Введення мультипробіотика СИМ інтактним щурам викликало в тимоцитах (рис. 1.) і спленоцитах (рис. 2.) зростання активності NOS на 11% і 36% ( $p \leq 0,05$ ) та вмісту нітрит-іонів на 20% ( $p \leq 0,05$ ) і 18% відповідно, порівняно з контролем.

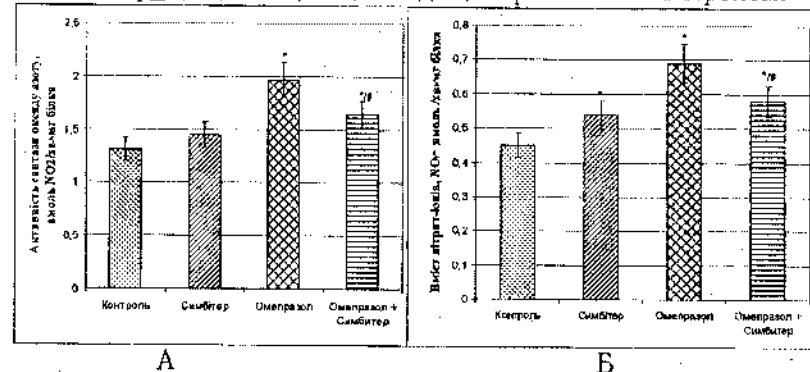


Рис. 1. Активність синтази оксиду азоту (А) та вміст нітрит-іонів (Б) в тимоцитах щурів з тривалою гіпоацидністю шлункового соку та за умов введення мультипробіотика ( $M \pm m$ ,  $n=10$ ): \* -  $p \leq 0,05$  порівняно з контролем; # -  $p \leq 0,05$  порівняно з групою тварин, яким вводили омепразол.

28-добове пригнічення шлункової секреції соляної кислоти, викликане введенням ОМ, призводило до значного зростання в тимоцитах (рис. 1.) і спленоцитах (рис. 2.) активності NOS на 50% ( $p \leq 0,05$ ) і 75% ( $p \leq 0,05$ ) відповідно та вмісту нітрит-іонів на 53% ( $p \leq 0,05$ ) і 58% ( $p \leq 0,05$ ) порівняно з контролем.

Введення мультипробіотика СИМ щурам разом з ОМ також призводило до підвищення порівняно з контролем відповідно в тимоцитах (рис. 1.) і спленоцитах (рис. 2.) активності

NOS на 25% ( $p \leq 0,05$ ) і 41% ( $p \leq 0,05$ ) та вмісту нітрит-іонів на 29% ( $p \leq 0,05$ ) і 25% ( $p \leq 0,05$ ). Але порівняно з групою тварин з гіпоацидним станом ці показники були відповідно нижчими приблизно на 20% ( $p \leq 0,05$ ) та достовірно не відрізнялись від показників у групі щурів, яким вводили лише СИМ.

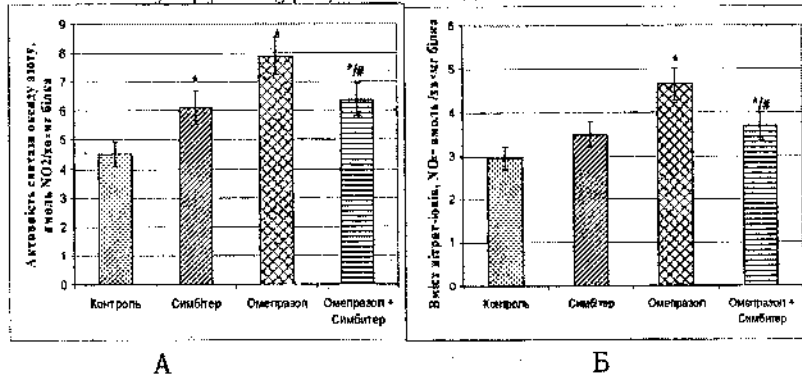


Рис. 2. Активність синтази оксиду азоту (А) та вміст нітрит-іону (Б) в спленоцитах щурів з тривалою гіпоацидністю шлункового соку та за умов введення мультипробіотика ( $M \pm m$ ,  $n=10$ ): \* -  $p \leq 0,05$  порівняно з контролем; # -  $p \leq 0,05$  порівняно з групою тварин, яким вводили омепразол.

Збільшення рівня продукції NO в тимусі та селезінці щурів усіх дослідних груп корелює з зафіксованим нами в попередніх дослідженнях збільшенням вмісту інтерферону в культуральному середовищі тимоцитів і спленоцитів [21], який є індуктором iNOS [2]. 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 [22].

Зростання продукції NO в лімфоїдних клітинах щурів на введення мультипробіотика СИМ може свідчити про імуномодуючі властивості цього препарату, внаслідок здатності пробіотичних мікроорганізмів СИМ викликати на себе імунну відповідь.

Аналіз отриманих результатів дослідження активності NOS та вмісту нітрит-іонів дозволяє стверджувати про значне збільшення вмісту NO в тимусі та селезінці щурів за умов розвитку порушень мікробіоценозу в травному тракті на фоні 28-добової шлун-

кової гіпоацидності. Встановлений ефект може бути обумовлений декількома причинами. По-перше, збільшення рівня NO в тимоцитах і спленоцитах може бути пов'язано 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 [10].

По-друге, за даних умов, ймовірно, може відбуватись активація клітинної ланки імунітету, адже NO вибірково здатен посилювати проліферацію Т-хелперів1 [23], активацію Т-клітин та регулювати продукцію цитокінів [24, 25]. Додатковим доказом активації клітинно-опосередкованої імунної відповіді за даних умов також може свідчити зафіксоване нами в попередніх дослідженнях зростання рівня ІФН- $\gamma$  в сироватці крові [26] та продукції ІФН [21] клітинами досліджуваних лімфоїдних органів і відносного вмісту лімфоїдних клітин в тимусі [27]. Внаслідок цього може відбуватись посилення проліферативних процесів у тимусі для залучення нових лімфоцитів у імунну відповідь, що зазвичай, також супроводжуються збільшенням рівня NO-індукованого апоптозу, за допомогою якого гинуть Т-лімфоцити під час негативної селекції [20].

По-третє, не можна виключати й те, що таке збільшення рівня продукції NO та його можливе накопичення в тимусі та селезінці щурів може бути пов'язане з розвитком імунної дисфункції за умов розвитку запалення [28], в тому числі й внаслідок дії ОМ, який як відомо здатен пригнічувати функції імунних клітин [29]. Крім того, збільшення продукції NO в даній групі тварин, може впливати на рівень активації лімфоцитів за допомогою зворотніх порушень в Jak3/STAT5 сигнального шляху [30].

Введення ж мультипробіотика СИМ за умов тривалого гіпоацидного стану в шлунку запобігає надлишковій продукції NO в тимусі та селезінці шляхом усунення дисбіотичних змін в шлунку та товстому кишечнику та зменшення запального процесу.

### Висновки

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.

### Література

1. Bogdan C. Nitric oxide and the immune response / C. Bogdan // *Nat. Immunol.* - 2001. - Vol.2. - P.907-916.
2. Ройт А. Иммунология / А. Ройт, Дж. Бростофф, Д. Мейл ; пер. с англ. - М.: Мир, 2000. - 592 с.
3. 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.
4. 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.
5. Taylor-Robinson A.W. 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 // *Eur. J. Immunol.* - 1994. - Vol.24. - P.980-984.
6. Moilanen E. Nitric Oxide in Inflammation and Immune Response / E. Moilanen, H. Vapaatalo // *Annals of Medicine.* - 1995. - Vol.27, Issue 3. - P.359-367.
7. Chang R.H. Nitric oxide increased interleukin-4 expression in T lymphocytes / R.H. Chang, M.H. Feng, W.H. Liu, M.Z. Lai // *Immunology.* - 1997. - Vol.90. - P.364-369.
8. Сомова Л.М. Оксид азота как медиатор воспаления / Л.М.Сомова, Н.Г.Плехова // *Вестник ДВО РАН.* - 2006. - № 2. - С.77-80.
9. 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.
10. Williams C. Proton Pump Inhibitors and bacterial overgrowth / C.Williams, K.E.L. McColl // *Alimentary pharmacology and Therapeutic.* - 2006. - Vol. 23. - P. 3-10.
11. Proinflammatory cytokines concentration in blood serum of rats with the long-term gastric secretion suppression of hydrochloric acid / O.Korotkiy, T.Karpovets, S.Pilipenko [e.a.] // *European Journal of Clinical Investigation.* - 2010. - Vol.40, Supplement 1 (44th Annual Scientific Meeting of the

*European Society for Clinical Investigation, Bari, Italy, 24 - 27 February, 2010).* - P.14.

12. Сторожков Г.И. Оценка методик проведения исследований / Г.И.Сторожков, Е.А.Малышева // *Качественная клиническая практика.* - 2001. - №1. - С.21-30.
13. Voym A. Separation of lymphocytes, lymphocyte subgroups and monocytes: a review / A.Voym // *Lymphology.* - 1977. - Vol.10.-- P. 71-76.
14. Лимфоциты : методы / [Саймонт Хант, Дон Мейсон, Джон Пенхейл и др. ; под ред. Дж. Клауса ; пер. с англ]. - М.: Мир, 1990. - 395 с.
15. 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. - V.266, № 34. - P. 22789-22791.
16. Analysis of nitrate, nitrit and [<sup>15</sup>N] nitrate in biological fluids / L.C.Green, A.W.David, J.Glogowski [et al.] // *Anal. Biochem.* - 1982. - Vol.126, №1. - P. 131-138.
17. Duan Sh. S-nitrosylation/ Denitrosylation and Apoptosis of Immune Cells / Sh. Duan, Ch.Chen // *Cel. Mol. Immunol.* - 2007. - Vol.4, № 5. - P.353-358.
18. Niedbala W. Role of nitric oxide in the regulation of T cell junctions / W.Niedbala, B.Cai, F.Y.Liew // *Ann. Rheum. Dis.* - 2006. - Vol.65, Suppl.3. - P.37-40.
19. Benhar M. A central role for S-nitrosylation in apoptosis / M.Benhar, J.S. Stamler // *Nat. Cell. Biol.* - 2005. - Vol.7. - P.645-646.
20. 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.
21. Вміст інтерферону в супернатанті клітинних культур тимоцитів і спленоцитів щурів за умов тривалої гіпоацидності шлункового соку / О.Г.Короткий, І.В.Компанець, В.В.Нікольська [та ін.] // *Укр. біохім. журн.* - 2010. - Т. 82, № 4 (додаток 2) - С.110 (X Український біохімічний з'їзд, 13-17 вересня 2010р., м. Одеса, Україна).
22. Тоголян А.А. Клетки иммунной системы / А.А.Тоголян, И.С.Фрейдлин. - СПб.: Наука, 2000. - 232 с.
23. Nitric oxide preferentially induces type 1 T cell differentiation by selectively up-regulating IL-12 receptor 2 expression via cGMP

/ W.Niedbala, X.Q.Wei, C.Campbell [e.a.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* - 2002. - Vol.99. - P.16186-16191.

24. 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.37-40.

25. Nitric Oxide Mediates T Cell Cytokine Production and Signal Transduction in Histidine Decarboxylase Knockout Mice / A.Koncz, M.Pasztol, M.Mazan [e.a.] // *J. Immunol.* - 2007. - Vol.179. - P.6613-6619.

26. Вплив мультипробіотиків на вміст інтерферону-гамма в сироватці крові щурів за умов тривалої гіпоацидності / О.Короткий, С.Пилипенко, О.Цирюк [та ін.] // *Вісник Київського національного університету. Біологія.* - 2009. - Вип. 54. - С.47-49.

27. Реакція лімфоїдних органів щурів на введення мультипробіотика "Симбітер® ацидофільний" концентрований за умов тривалого зниження шлункової секреції соляної кислоти / О.Г.Короткий, С.В.Пилипенко, І.В.Компанець, Л.І.Остапченко // *Вісник проблем біології і медицини.* - 2010. - Вип. 3. - С. 55-60.

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

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

30. 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, U.R. Kees // *The Journal of Immunology.* - 1998. - Vol.160. - P.5729-5734.

#### Резюме

**Короткий О.Г., Пилипенко С.В., Максимович Я.С., Берегова Т.В., Остапченко Л.І.** *Продукція оксиду азоту тимоцитами та спленоцитами щурів з тривалою шлунковою гіпоацидністю та за умов введення мультипробіотика "Симбітер® ацидофільний".*

Досліджено активність синтази оксиду азоту та вміст нітрит-іонів у тимоцитах і спленоцитах щурів з тривалою шлунковою гіпоацидністю та за умов введення мультипробіотика "Симбітер® ацидофільний". Встановлено, що за умов 28-добового зниження шлункової секреції соляної кислоти, викликаного введенням омепразолу, в тимоцитах і спленоцитах

тах щурів спостерігається значне зростання активності синтази оксиду азоту та вмісту нітрит-іонів порівняно з контролем. Показано, що введення мультипробіотика "Симбітер® ацидофільний" викликає незначне збільшення NO-синтазної активності та вмісту нітрит-іонів у тимоцитах і спленоцитах інтактних щурів та зменшує ці показники в групі щурів з тривалою шлунковою гіпоацидністю порівняно з групою тварин, яким вводили лише омепразол.

**Ключові слова:** шлункова гіпоацидність, мультипробіотик, тимоцити, спленоцити, оксид азоту.

#### Резюме

**Короткий А.Г., Пилипенко С.В., Максимович Я.С., Берегова Т.В., Остапченко Л.І.** *Продукция оксида азота тимоцитами и спленоцитами крыс с длительной желудочной гипoaцидностью и при введении мультипробіотика "Симбітер® ацидофільний".*

Исследовано активність синтазы оксиду азоту и содержание нитрит-ионов в тимоцитах и спленоцитах крыс с длительной желудочной гипoaцидностью и при введении мультипробіотика "Симбітер® ацидофільний". При 28-суточном снижении желудочной секреции соляной кислоты, вызванном введением омепразола, в тимоцитах и спленоцитах крыс наблюдается значительное увеличение NO-синтазной активности и содержания нитрит-ионов по сравнению с контролем. Показано, что введение мультипробіотика "Симбітер® ацидофільний" вызывает незначительное увеличение активности синтазы оксиду азоту и содержания нитрит-ионов в тимоцитах и спленоцитах интактных крыс и уменьшает эти показатели в группе крыс с длительной желудочной гипoaцидностью по сравнению с группой животных, которым вводили только омепразол.

**Ключевые слова:** желудочная гипoaцидность, мультипробіотик, тимоциты, спленоциты, оксид азота.

#### Summary

**Korotkyi O.G., Pylypenko S.V., Maksymovych Ia.S., Beregova T.V., Ostapchenko L.I.** *Production of nitric oxide by thymocytes and splenocytes of rats with long-term gastric hypoaacidity and at introduction of multiprobiotic "Symbiter® acidophilic".*

It was investigated the nitric oxide synthase activity and nitrite ion level in thymocytes and splenocytes of rats with long-term gastric hypoaacidity and at introduction of multiprobiotic "Symbiter® acidophilic". Lowering of gastric acid secretion during 28 days evoked by daily injection of omeprazole leads to useful increase of nitric oxide synthase activity and nitrite ion level in thymocytes and splenocytes in comparison with control. It was shown that introduction of multiprobiotic "Symbiter® acidophilic" evokes minor increase of nitric oxide synthase activity and nitrite ion level in thymocytes and splenocytes of intact rats and decrease of these indices in group rats with with long-term gastric hypoaacidity as compared to the group of animals which it was injected only omeprazole.

**Key words:** gastric hypoaacidity, multiprobiotic, thymocyte, splenocyte, nitric oxide.

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