

DOI: 10.26693/jmbs02.03.220

УДК 577.27:591.85:[599.323.4]-047.37

Пилипенко С. В.

КОНЦЕНТРАЦІЯ ПРО- ТА АНТИЗАПАЛЬНИХ ЦИТОКІНІВ У СИРОВАТЦІ КРОВІ ЩУРІВ ПІСЛЯ ТРИВАЛОГО ВВЕДЕННЯ ОМЕПРАЗОЛУ ТА ОДНОЧАСНОГО ВВЕДЕННЯ МУЛЬТИПРОБІОТИКІВ І ОМЕПРАЗОЛУ

Полтавський національний педагогічний університет ім. В. Г. Короленка

pilipenko_s@ukr.net

На сьогоднішній день дані літератури що до ролі цитокінів у запальному процесі в шлунку і кишечнику, який розвивається на фоні тривалої гіпоацидності шлункового соку за відсутності *H. pylori* інфікування, обмежені і стосуються лише окремих цитокінів.

Мета дослідження – дослідити баланс про- та антизапальних цитокінів у сироватці крові щурів під час тривалої гіпоацидності шлункового соку та вплив на нього мультипробіотиків.

Дослідження проведені на білих нелінійних щурах-самцях з початковою вагою 160-180 г, розділених на чотири групи по 10 тварин у кожній. Щури I групи слугували контролем, їм упродовж 28 днів щоденно внутрішньоочередово (в/о) вводили 0,5 мл води для ін'єкцій. Щурам II групи щоденно упродовж 28 днів вводили один раз на добу внутрішньоочередово (в/о) омепразол (виробництва "Sigma-Aldrich" США) в дозі 14 мг/кг, розчинений в 0,2 мл води для ін'єкцій. Тваринам третьої групи один раз на добу упродовж 28 днів сумісно вводили омепразол та мультипробіотик "Симбітер[®] ацидофільний" концентрований (Симбітер). Тваринам четвертої групи один раз на добу упродовж 28 днів сумісно вводили омепразол та мультипробіотик "Апібакт[®]" (Апібакт).

Мультипробіотики Симбітер і Апібакт (виробництва НВК "О.Д. Пролісок", Україна) вводили сумісно з омепразолом п/о в дозі 140 мг/кг ($1,4 \cdot 10^{10}$ КУО/кг).

Пригнічення секреції гідрохлоридної кислоти в шлунку щурів упродовж 28-ми днів омепразолом приводило до дисбалансу між про- та антизапальними цитокінами: концентрації прозапальних цитокінів ІФН- γ , ФНП- α , ІЛ-1 β істотно зростали, ІЛ-12 40р зменшувалась, а ІЛ-6 не змінювалась. Одночасно змінювались концентрації протизапальних цитокінів: концентрація ІЛ-4 зменшувалась, а ІЛ-10 зростала.

Тривале введення мультипробіотичних препаратів на фоні шлункової гіпохлоргідрії суттєво

зменшувало прояви запального процесу в слизових оболонках шлунка та товстої кишки, що проявлялось у нормалізації балансу між про- та антизапальними цитокінами.

Ключові слова: запальний процес, цитокіни, сироватка крові, мультипробіотики, гіпоацидність шлункового соку, омепразол.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дослідження проведені в рамках наукової теми Навчально-наукового центру «Інститут біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка як складова частина комплексної теми «Механізми реалізації адаптаційно-компенсаторних реакцій організму за умов розвитку різних патологій», № держ. реєстрації 0111U004648.

Вступ. З 90-х років минулого століття починаються інтенсивні дослідження етіологічної ролі *H. pylori* не тільки в розвитку виразкової хвороби, але і в запаленні слизової оболонки шлунка. Загальноприйнято, що в основі виразкової і пухлинної хвороби шлунка, а також запальних захворювань кишечника лежить хронічне запалення, викликане *H. pylori* [8, 12, 14, 21, 27, 30]. Що стосується ролі цитокінів у запальному процесі в шлунку і кишечнику, що розвивається на фоні тривалої гіпоацидності шлункового соку за відсутності *H. pylori* інфікування, дані літератури обмежені і стосуються лише окремих цитокінів. Так, показано, що надекспресія ІЛ-1 β , за відсутності *H. pylori* інфікування, є необхідною у розвитку раку шлунка, і даний цитокін є одним з важливих прозапальних цитокінів, рівень яких змінюється під час *H. pylori* інфекції, що приводить до атрофії слизової оболонки шлунка, метаплазії і неопластичної трансформації [11, 28, 29].

Мета дослідження – дослідити баланс про- та антизапальних цитокінів у сироватці крові щурів під час тривалої гіпоацидності шлункового соку та вплив на нього мультипробіотиків.

Об'єкт і методи дослідження. Дослідження проведені на білих нелінійних щурах-самцях з початковою вагою 160-180 г, розділених на чотири групи по 10 тварин у кожній. Щури I групи слугували контролем, їм упродовж 28 днів щоденно внутрішньоочередово (в/о) вводили 0,5 мл води для ін'єкцій. Щурам II групи щоденно упродовж 28 днів вводили один раз на добу внутрішньоочередово (в/о) омепразол (виробництва "Sigma-Aldrich" США) в дозі 14 мг/кг, розчинений в 0,2 мл води для ін'єкцій [1]. Тваринам третьої групи один раз на добу упродовж 28 днів сумісно вводили омепразол та мультипробіотик "Симбітер[®] ацидофільний" концентрований (Симбітер). Тваринам четвертої групи один раз на добу упродовж 28 днів сумісно вводили омепразол та мультипробіотик "Апібакт[®]" (Апібакт).

Мультипробіотики Симбітер і Апібакт (виробництва НВК "О.Д. Пролісок", Україна) вводили сумісно з омепразолом п/о в дозі 140 мг/кг ($1,4 \cdot 10^{10}$ КУО/кг) [Вірченко О.В. та ін., 2013].

Тварин утримували в акредитованому віварію Навчально-наукового центру "Інститут біології" Київського національного університету імені Тараса Шевченка згідно зі "Стандартними правилами по упродовженню, устаткуванню та утриманню експериментальних біологічних клінік (віваріїв)". Всі експерименти проведені відповідно до Закону України № 3447-IV "Про захист тварин від жорстокого поводження".

Перед початком експерименту щурів утримували на голоді з вільним доступом до води упродовж 12 годин.

Концентрацію ІФН- γ , ФНП- α , ІЛ в сироватці крові щурів визначали імуноферментним методом за допомогою комерційних наборів («GE Healthcare: Amersham», Великобританія) [7]. В лунки імунологічних планшетів (96 лунок), які попередньо іммобілізовані антитілами до цих цитокінів, вносили 50 мкл зразку 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 кожну 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 і інкубували при 25° С 30 хв. Потім 3 рази промивали буфером, 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 кожну лунку 100 мкл 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.

Результати досліджень та їх обговорення. Ми визначали вміст про- та антизапальних цитокінів в сироватці крові щурів у щурів контрольної групи та після 28-ми днів пригнічення секреції НСІ омепразолом в шлунку, а також за умов тривалого введення омепразолу і запропонованих засобів корекції, а саме – пробіотичних препаратів, одним з механізмів впливу яких на імунну відповідь є їх здатність індукувати синтез цитокінів [20, 22].

Встановлено, що після 28 днів введення омепразолу концентрація прозапального цитокіну ІФН- γ зростала на 58,5% ($p < 0,05$). Це відбувалось на фоні пригнічення моторної активності шлунка і товстої кишки. Одержані результати можна співставити з даними, наведеними в роботі [18]. Автори виявили зростання рівня ІФН- γ в тонкому кишечнику при післяопераційному ілеусі і зробили висновок про те, що ІФН- γ стимулює інтестинальні макрофаги, а це веде до надпродукції NO, який паралізує міоцити і, врешті, веде до гіпомоторики кишечника. В наших дослідженнях кишечник щурів не був оперованим, проте ми спостерігали зростання концентрації ІФН- γ в сироватці крові на фоні пригнічення моторики травного тракту. Також одержані нами результати узгоджуються з результатами інших авторів [26]. Автори показали зменшення амплітуди скорочень в товстій кишці у мишей з експериментальним колітом на фоні зростання ІФН- γ в сироватці крові.

За умов тривалого сумісного введення омепразолу і мультипробіотика «Симбітер» концентрація ІФН- γ в сироватці крові щурів була на 30,8% ($p < 0,05$) меншою у порівнянні з групою щурів, яким вводили один омепразол, і статистично достовірно не відрізнялася від даного показника у щурів контрольної групи. Дія мультипробіотика «Апібакт» була дещо слабшою у попередженні зростання концентрації ІФН- γ в сироватці крові, індукованого тривалою гіпохлоргідрією. Після 28-ми денного сумісного введення омепразолу і мультипробіотика «Апібакт» концентрація ІФН- γ в сироватці крові щурів була на 24,6% ($p < 0,05$) меншою у порівнянні з групою щурів, яким вводили один омепразол, і на 19,5% ($p < 0,05$) перевищувала даний показник в контролі.

Після 28 днів введення омепразолу в сироватці крові щурів зростала концентрація і іншого прозапального цитокіну – ФНП- α . Це зростання склало 73,3% ($p < 0,05$).

Так як у нашому випадку *H. pylori* інфікування було відсутнє ми припустили, що дисбіотичні зміни в шлунку можуть бути причиною імунної відповіді і інтенсивної продукції прозапальних цитокінів. На користь такої гіпотези свідчить робота Brzozowski та співав. [16], в якій показано, що надмірна колонізація шлунку грибами роду *Candida* у щурів може бути досягнута шляхом введення їм антисекреторного препарату ранітідину. При цьому кандідоз супроводжувався збільшеною експресією і вивільненням ІЛ-1 β і TNF α , свідченням чого був збільшення їх вміст в плазмі крові. Відмічено збільшення колонізації шлунка грибами роду *Candida* після 28-ми днів введення щурам іншого антисекреторного препарату омепразолу. Тобто, пригнічення секреції HCl в шлунку, незалежно від природи антисекреторного препарату, веде до кандідозу в травному тракті і наслідків, пов'язаних з цим.

Відомо, що ліпополісахариди, які є головними компонентами зовнішньої мембрани аеробних грам-негативних бактерій *E. coli* (ендотоксини), у 1000 разів сильніше впливають на виділення прозапальних цитокінів, ніж ліпополісахариди *H. pylori* [13]. Експериментальні дослідження також показали, що бактеріальні ліпополісахариди порушують процеси гоєння в слизовій оболонці шлунка через зменшення кровотоку в слизовій оболонці шлунка, збільшену експресію та вивільнення прозапальних цитокінів ІЛ-1 β та ФНП- α , дисбаланс між про- та анти-апоптотичними членами родини Bcl-2 [15].

В наших попередніх експериментах було показано, що після 28-ми днів пригнічення шлункової секреції омепразолом в кишечнику більше, ніж вдвічі зростала концентрація *E. coli* (зі зміненими ферментативними властивостями), майже в 4 рази зростала концентрація *E. coli* (лактозонегативної). В шлунку майже вдвічі зростала концентрація *E. coli*, а також з'являлась *Escherichia coli* (лактозонегативна), концентрація якої складала 10^4 КУО/г. Отже, у нас є всі підстави стверджувати, що розвиток дисбактеріозу у різних біотопах травного тракту, спричинений пригніченням секреції HCl в шлунку, є однією з головних причин зростання концентрації прозапальних цитокінів в сироватці крові щурів.

За умов тривалого сумісного введення омепразолу і мультипробіотичних препаратів «Симбітер» і «Апібакт» концентрація ФНП- α в сироватці крові щурів зменшувалась на 15,4% ($p < 0,05$) та 17,9% ($p < 0,05$), відповідно, у порівнянні з групою щурів, які упродовж такого ж часу отримували один омеп-

разол. Порівняно з контрольною групою щурів, у щурів, яким упродовж 28 днів сумісно вводили омепразол і мультипробіотики «Симбітер» та «Апібакт», концентрація ФНП- α в сироватці крові щурів залишалася відповідно на 46,7% ($p < 0,05$) і 42,2% ($p < 0,05$) більшою. Отже, «Симбітер» і «Апібакт» приблизно однаково впливали на концентрацію ФНП- α в сироватці крові щурів.

ІФН- γ є не тільки медіатором активації макрофагів. Він збільшує фагоцитоз і продукцію інших прозапальних цитокінів, впливає на виділення нейропептидів [10, 24]. В зв'язку з цим ми визначили в сироватці крові концентрацію і інших цитокінів.

Нами встановлено, що після 28-ми днів введення щурам омепразолу концентрація прозапального цитокіну ІЛ-1 β зростала 80,2% ($p < 0,05$) у порівнянні з контролем (рис. 1).

Після 28-ми денного сумісного введення щурам омепразолу і мультипробіотика «Симбітер» концентрація ІЛ-1 β в сироватці крові зменшувалась на 22,5% ($p < 0,05$) порівняно з групою щурів, яким вводили один омепразол. Проте вона залишалася на 39,6% більшою ($p < 0,05$) у порівнянні з концентрацією ІЛ-1 β в сироватці крові щурів контрольної групи (рис. 1 А). У щурів, яким упродовж 28-ми днів вводили омепразол і мультипробіотик «Апібакт» концентрація ІЛ-1 β в сироватці крові була на 40,5% ($p < 0,05$) меншою порівняно з групою щурів, яким вводили один омепразол, і статистично достовірно не відрізнялася від даного показника у щурів контрольної групи (рис. 1 А).

За даними літератури, характерною особливістю запального процесу в кишечнику є підвищення експресії генів ІФН- γ , ІЛ-1 β і ФНП- α [6]. Ці дані також узгоджуються з нашими результатами відносно зростання концентрації ІФН- γ , ІЛ-1 β і ФНП- α в сироватці крові щурів після тривалого введення омепразолу, адже ми стверджуємо, що дисбактеріоз, викликаний тривалим пригніченням омепразолом секреції HCl в шлунку, є причиною запального процесу в усіх слизових оболонках травного тракту, в т.ч. і кишечника.

За умов тривалого пригнічення секреції HCl, яке призводить до розвитку гіпергастринемії і дисбактеріозу в шлунково-кишковому тракті, порушується баланс між про- і антизапальними цитокінами. Надмірні кількості прозапальних цитокінів посилюють розвиток морфологічних змін в шлунку і товстій кишці, які ведуть до канцерогенезу. Механізм такого впливу багатогранний. Прозапальні цитокіни безпосередньо впливають на паріетальні клітини і пригнічують секрецію HCl, стимулюють синтез і виділення гастрину [27], пригнічують моторику травного тракту [17, 23]. Що стосується секреції гастрину, на наш погляд, важливою є робота, в

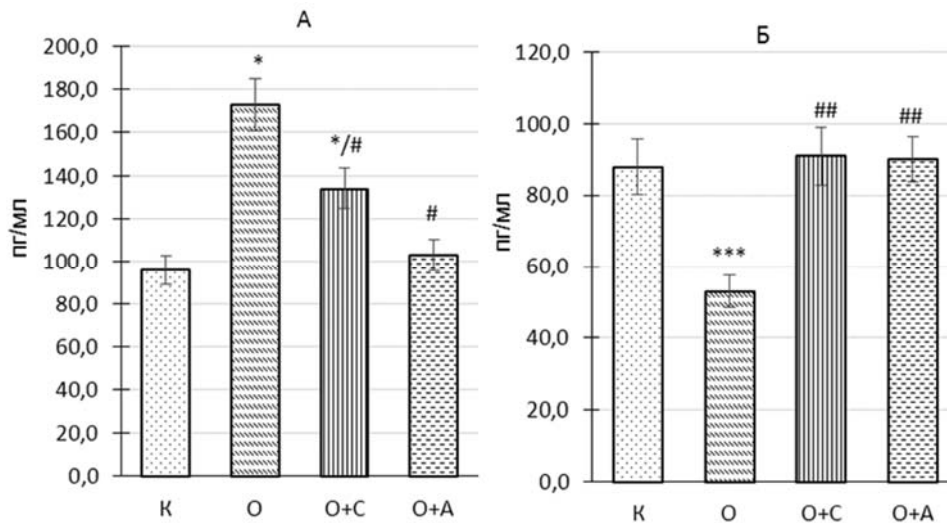


Рис. 1. Концентрація ІЛ-1β (А) та ІЛ-4 (Б) у сироватці крові щурів, (М±m):

Примітки: К – контрольна група (n=10); О – група щурів після 28-ми денного введення омепразолу (n=10); О+С – група щурів після 28-ми денного сумісного введення омепразолу та мультипробіотика «Симбітер» (n=10); О+А – група щурів після 28-ми денного сумісного введення омепразолу та мультипробіотика «Апібакт» (n=10); * - p<0,05 порівняно з контролем; # - p<0,05 порівняно з групою тварин, яким вводили омепразол

якій показано, що ІЛ-1β і ФНП-α можуть прямо регулювати експресію гену гастрину через мітоген-активовану протеїнкіназу- і протеїнкіназа С-залежний механізм [27]. Автори наведеної роботи припустили, що ІЛ-1β і ФНП-α можуть відігравати пряму роль у гіпергастринемії, викликаній *Helicobacter pylori*. Наші результати стосовно розвитку гіпергастринемії і дисбактеріозу в шлунку і кишечнику, індукованих тривалою гіпоацидністю шлункового соку, і виявлене зростання рівня ІЛ-1β і ФНП-α в сироватці крові щурів, дозволяють зробити більш узагальнюючий висновок: ІЛ-1β і ФНП-α можуть відігравати роль в гіпергастринемії, індукованій гіпоацидністю шлункового соку будь-якого ґенезу.

Відома здатність прозапального цитокіну ІЛ-1β викликати дозо-залежне розслаблення полосок фундального відділу шлунка в експериментах *in vitro* [17]. Kindt та співат. [23] показали, що одноразове введення ІЛ-1β відіграє збуджуючу і нейромодуючу роль в мієнтеральному плетиві, проте тривала інкубація ІЛ-1β з препаратом мієнтерального плетива гладеньких м'язів порожньої кишки мурчаків дозо-залежно впливає на нейрональну відповідь і зростання концентрації іонізованого [Ca²⁺], індукованих серотоніном і АТФ, а також впливає на амплітуду швидкого кальцієвого струму, викликаного серотоніном та АТФ. Пік зростання концентрації іонізованого [Ca²⁺] після електричної стимуляції м'язових волокон кишки зменшувався під впливом ІЛ-1β. Також ІЛ-1β подовжував тривалість зростання концентрації іонізованого [Ca²⁺] після електричної стимуляції м'язових волокон кишки.

На сьогодні доведено, що ІЛ-1β є сильним інгібітором скорочень гладеньких м'язових волокон тонкої кишки, клубової і товстої кишок у відповідь на ацетилхолін [4]. В цій роботі показано, що попереднє введення блокатора синтезу білка циклогексиміду блокувало викликане ІЛ-1β гальмування скорочень тонкої кишки, стимульованих ацетилхоліном, що дало авторам підстави припустити залучення нового синтезованого білку в цей ефект. Інгібітор NO-синтази, N_w-nitro-L-arginine, не попереджував гальмування, викликане ІЛ-1β. Блокада нервової передачі тетродоксином усувала ефект ІЛ-1β на скоротливу активність тонкої кишки, в той час як ІЛ-1β не впливав на ізольовані гладеньком'язові клітини. Автори заключили, що цей ефект не включає міогенний механізм, але опосередковується через мієнтеральне плетиво. Пізніше цією ж групою авторів було доведено, що ключовим медіатором гальмівного ефекту ІЛ-1β на індуковані ацетилхоліном скорочення кишечника є вазоактивний інтестинальний пептид [5].

Таким чином, одним з механізмів пригнічення моторики травного тракту за умов тривалої гіпоацидності шлункового соку може бути зростання в слизовій шлунково-кишкового тракту, і як наслідок, в сироватці крові прозапальних цитокінів ІЛ-1β та ІФН-γ. Зменшення концентрації прозапальних цитокінів ІФН-γ, ІЛ-1β і ФНП-α під впливом мультипробіотиків є одним з механізмів відновлення моторики шлунка і товстої кишки за умов їх сумісного введення з омепразолом.

Після 28-ми днів введення омепразолу концентрація протизапального цитокіну ІЛ-4 в сироватці

крові щурів зменшувалась на 39,8% ($p < 0,001$) у порівнянні з контролем (рис. 1 Б). Додавання до омепразолу мультипробіотика «Симбітер» або «Апібакт» запобігало зменшенню концентрації ІЛ-4 в сироватці крові щурів. За цих умов концентрація ІЛ-4 була такою ж, як в контрольній групі щурів (рис. 1 Б).

Тривала гіпоацидність шлункового соку, індукована омепразолом, не впливала на концентрацію прозапального цитокіну ІЛ-6 у сироватці крові щурів (рис. 2). Сумісне введення щурам упродовж 28-ми днів омепразолу і мультипробіотичних препаратів також не справляло ефекту на концентрацію ІЛ-6 у сироватці крові (рис. 2).

На сьогодні доведено, що прозапальні цитокіни ІФН- γ , ФНП- α , ІЛ-1 β і ІЛ-6 відіграють ключову роль у захисті організму від патогенних мікроорганізмів [3]. За умов розвитку запального процесу цитокіни синтезуються в наступній послідовності: ФНП- α , ІЛ-1 β , ІФН- γ і ІЛ-6. Далі ІЛ-6 пригнічує виділення ФНП- α і ІЛ-1 β , при цьому активується гуморальна ланка імунітету [3, 9]. В зв'язку з цим ІЛ-6 розглядають як прозапальний, так і протизапальний цитокін. На відміну від ІЛ-6, ІФН- γ вважають головним стимулятором клітинно-опосередкованої імунної відповіді [19]. В наших дослідженнях концентрація ІЛ-6 в сироватці крові щурів після 28-ми днів введення омепразолу не змінювалась, що свідчить про можливу відсутність суттєвого гальмівного впливу ІЛ-6 на секрецію ФНП- α і ІЛ-1 β .

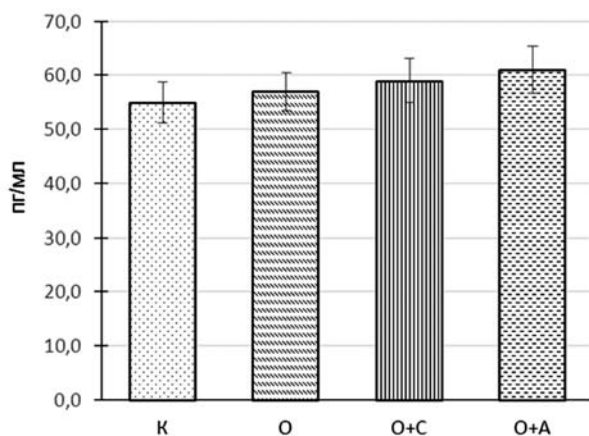


Рис. 2. Концентрація ІЛ-6 у сироватці крові щурів, ($M \pm m$):

Примітки: К – контрольна група ($n=10$); О – група щурів після 28-ми денного введення омепразолу ($n=10$); О+С – група щурів після 28-ми денного сумісного введення омепразолу та мультипробіотика «Симбітер» ($n=10$); О+А – група щурів після 28-ми денного сумісного введення омепразолу та мультипробіотика «Апібакт» ($n=10$)

Також можна заключити, що за даних умов активується, перш за все, клітинно-опосередкована ланка імунітету. Відсутність впливу мультипробіотиків на рівень ІЛ-6 в сироватці крові щурів за умови їх сумісного введення з омепразолом не викликає подиву, якщо взяти до уваги загально відомі факти про те, що різні бактерії-коменсали можуть по-різному брати участь в регуляції мукозного і системного імунітету. Була вивчена реакція двох типів антигенпрезентуючих клітин, моноцитів і дендритних клітин на різні штами типових бактерій кишкової мікрофлори [22]. Очищені людські моноцити і дендритні клітини, похідні моноцитів, автори стимулювали УФ-інактивованими грам-позитивними бактеріями *L. plantarum* і *Bifidobacterium adolescentis*, а також грам-негативними бактеріями *E.coli* і *Veillonella parvula*. Було встановлено, що моноцити продукували більш високі рівні ІЛ-12 і ФНП- α при стимуляції бактеріями *L. plantarum*, ніж при стимуляції бактеріями *E.coli* і *Veillonella parvula*. На противагу цьому, дендритні клітини, похідні моноцитів, продукували великі кількості ІЛ-6, ІЛ-10, ІЛ-12 і ФНП- α при стимуляції *E.coli* і *Veillonella parvula*, але не реагували на *L. plantarum* і *Bifidobacterium adolescentis*. Слабка відповідь на грам-позитивні бактерії корелювала з низькою експресією на поверхні клітин рецепторів TLR-2 [22]. На основі наведеного, ми зробили висновок: багатоконпонентний склад мультипробіотиків групи «Симбітер» може бути причиною відсутності ефекту мультипробіотиків на секрецію ІЛ-6 за умов тривалої гіпоацидності шлункового соку.

Після 28-ми днів введення омепразолу концентрація протизапального імунорегуляторного цитокіну ІЛ-10 в сироватці крові щурів зростала на 44,4% ($p < 0,01$) у порівнянні з контролем (рис. 3 А). Сумісне введення щурам упродовж 28-ми днів омепразолу і мультипробіотика «Симбітер» або «Апібакт» запобігало збільшенню концентрації ІЛ-10 в сироватці крові щурів (рис. 3 А).

Після 28-ми днів введення щурам омепразолу концентрація прозапального цитокіну ІЛ-12 40р в сироватці крові зменшувалась на 36,6% ($p < 0,01$) у порівнянні з контролем.

Додавання до омепразолу мультипробіотика «Симбітер» або «Апібакт» запобігало зменшенню концентрації ІЛ-12 40р в сироватці крові щурів. За цих умов концентрація ІЛ-12 40р була такою ж, як в контрольній групі щурів (рис. 3 Б). Наші результати узгоджуються з даними роботи, в якій показано нормалізуючий вплив пробіотичних штамів мікроорганізмів на вміст прозапальних цитокінів в слизовій оболонці шлунково-кишкового тракту за умов розвитку в ньому запального процесу [2].

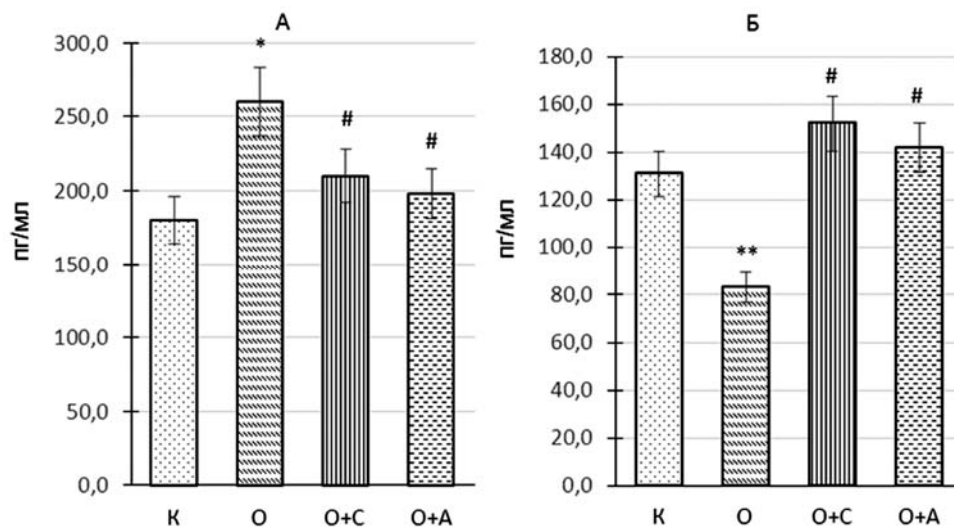


Рис. 3. Концентрація ІЛ-10 (А) та ІЛ-12 40р (Б) у сироватці крові щурів, (M±m):

Примітки: К – контрольна група (n=10); О – група щурів після 28-ми денного введення омепразолу (n=10); О+С – група щурів після 28-ми денного сумісного введення омепразолу та мультипробіотика «Симбітер» (n=10); О+А – група щурів після 28-ми денного сумісного введення омепразолу та мультипробіотика «Апібакт» (n=10); * - p<0,05 порівняно з контролем; # -p<0,05 порівняно з групою тварин, яким вводили омепразол

Одержані результати щодо змін в концентрації цитокінів в сироватці крові щурів після тривалого введення омепразолу узгоджуються з даними літератури, за якими одним з механізмів запального процесу в кишечнику є порушення балансу між про- і антизапальними цитокінами [25].

Висновки

1. Пригнічення секреції гідрохлоридної кислоти в шлунку щурів упродовж 28-ми днів омепразолом приводило до дисбалансу між про- та антизапальними цитокінами: концентрації прозапальних цитокінів ІФН-γ, ФНП-α, ІЛ-1β істотно зростали, ІЛ-12 40р зменшувалась, а ІЛ-6 не змінювалась. Одночасно змінювались концентрації про-

тизапальних цитокінів: концентрація ІЛ-4 зменшувалась, а ІЛ-10 зростала.

2. Тривале введення мультипробіотичних препаратів на фоні шлункової гіпохлоргідрії суттєво зменшувало прояви запального процесу в слизових оболонках шлунка та товстої кишки, що проявлялось у нормалізації балансу між про- та антизапальними цитокінами.

Перспективами подальших досліджень у цьому напрямку є більш повне дослідження балансу про- та антизапальних цитокінів у сироватці крові щурів після тривалого введення омепразолу та одночасного введення Симбітеру і Апібакту та інших пробіотичних препаратів та омепразолу.

References

1. Babin VN, Domaradskiy IV, Dubinin AV, Kondrakova OA. Biokhimiicheskiye i molekulyarnyye aspekty simbioza cheloveka i yego mikroflory. *Rossiyskiy khimicheskiy zhurnal*. 1994; 38 (6): 66-78. [Russian].
2. Mayanskiy AL, Mayanskiy NA, Zaslavskaya MI. Nuklearnyy faktor kB i vospaleniye. *Tsitokiny i vospaleniye*. 2007; 6 (2): 3-9. [Russian].
3. Royt A, Brostoff Dzh, Meyl D. *Immunologiya*. M: Mir; 2000. 592 s. [Russian].
4. Aubé AC, Blottière HM, Scarpignato C. Inhibition of acetylcholine induced intestinal motility by interleukin 1β in the rat. *Gut*. 1996; 39 (3): 470-4.
5. Aubé AC, Cherbut C, Rozé C. Vasoactive intestinal peptide is involved in the inhibitory effect of interleukin-1 beta on the jejunal contractile response induced by acetylcholine. *Gastroenterol Clin Biol*. 2001; 25 (12): 1090-5.
6. Barnett MPG, McNabb WC, Cookson AL. Changes in colon gene expression associated with increased colon inflammation in interleukin-10 gene-deficient mice inoculated with *Enterococcus* species. *BMC Immunol*. 2010; 11: 39. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2172/11/39>.
7. Chan DW, Perlstein NT. *Immunoassay. A Practical Guide*, Eds., Academic Press: New York; 1987. 71 p.
8. Russo F, Jirillo E, Clemente C, Messa C, Chiloiro M, Riezzo G, Amati L, Caradonna L, Di Leo A. Circulating cytokines and gastrin levels in asymptomatic subjects infected by *Helicobacter pylori* (*H. pylori*). *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2001; 1: 13-24. DOI: 10.1081/IPH-100102563.

9. Schindler R, Mancilla J, Endres S, Ghorbani R, Clark SC, Dinarello CA. 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. *Blood*. 1990 Jan 1; 75 (1): 40–7.
10. Elliott D. The substance P and somatostatin interferon-gamma immunoregulatory circuit. *Ann NY Acad Sci*. 1998; 240: 532-9.
11. El-Omar EM. The importance of interleukin 1beta in Helicobacter pylori associated disease. *Gut*. 2001; 48: 743-7.
12. Karttunen RA, Karttunen TJ, Yousfi MM, el-Zimaity HM, Graham DY, el-Zaatari FA. Expression of mRNA for interferon-gamma, interleukin-10, and interleukin-12 (p40) in normal gastric mucosa and in mucosa infected with Helicobacter pylori. *Scand J Gastroenterol*. 1997 Jan; 32 (1): 22–7. DOI: 10.3109/00365529709025058
13. Birkholz, S, Knipp U, Nietzki C, Adamek RJ, Opferkuch W. Immunological activity of lipopolysaccharide of *Helicobacter pylori* on human peripheral mononuclear blood cells in comparison to lipopolysaccharides of other intestinal bacteria. *FEMS Immunol. Med. Microbiol*. 1993; 6: 317-24.
14. Crabtree JE, Xiang Z, Lindley IJ, Tompkins DS, Rappuoli R, Covacci A. Induction of interleukin-8 secretion from gastric epithelial cells by a cagA negative isogenic mutant of Helicobacter pylori. *J Clin Pathol*. 1995; 48: 967-9.
15. Konturek PC, Brzozowski T, Konturek SJ, Kwiecien S, Dembinski A, Hahn EG. Influence of bacterial lipopolysaccharide on healing of chronic experimental ulcer in rats. *Scand J Gastroenterol*. 2001; 36: 1239-47.
16. Brzozowski T, Zwolinska-Wcislo M, Konturek PC, Kwiecien S, Drozdowicz D, Konturek SJ, Stachura J [et al]. Influence of gastric colonization with *Candida albicans* on ulcer healing in rats: effect of ranitidine, aspirin and probiotic therapy. *Scand J Gastroenterol*. 2005; 40 (3): 286-96.
17. Montuschi P, Tringali G, Parente L, Preziosi P, Navarra P. Interleukin-1 beta- and tumour-necrosis-factor-induced inhibition of rat gastric fundus motility in vitro. *Pharmacol Res*. 1994; 30: 25–33.
18. Koscielni A, Kaiff JC. T-helper C type 1 memory cells and postoperative ileus in the entire gut. *Curr Opin Gastroenterol*. 2011; 27 (6): 509-14.
19. Lawley TD, Walker AW. Intestinal colonization resistance. *Immunology*. 2013; 138 (1): 1-11.
20. Ng SC, Hart AL, Kamm MA, Stagg AJ, Knight SC. Mechanisms of action of probiotics: recent advances. *Inflamm Bowel Dis*. 2009; 15 (2): 300-10. doi: 10.1002/ibd.20602.
21. Noach LA, Bosma NB, Jansen J, Hoek FJ, van Deventer SJ, Tytgat GN. Mucosal tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-8 production in patients with Helicobacter pylori infection. *Scand J Gastroenterol*. 1994; 9: 425-9.
22. Karlsson Helen, Larsson Pia, Wold Agnes E, Rudin Anna. Pattern of cytokine responses to gram-positive and gram-negative commensal bacteria is profoundly changed when monocytes differentiate into dendritic cells. *Infect Immun*. 2004; 72 (5): 2671-8. doi: 10.1128/IAI.72.5.2671-2678.2004.
23. Kindt S, Vanden Berghe P, Boesmans W, Roosen L, Tack J. Prolonged IL-1beta exposure alters neurotransmitter and electrically induced Ca(2+) responses in the myenteric plexus. *Neurogastroenterol Motil*. 2010; 22 (3): 321–31. doi: 10.1111/j.1365-2982.2009.01414.x.
24. Schoenborn JR, Wilson CB. Regulation of interferon-γ during innate and adaptive immune responses. *Adv Immunol*. 2007; 96: 41–101.
25. Sanchez-Munoz F, Dominguez-Lopez A, Yamamoto-Furusho JK. Role of cytokines in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2008; 14 (27): 4280–8.
26. Ruysers NE, De Winter BY, De Man JG. Schistosoma mansoni proteins attenuate gastrointestinal motility disturbances during experimental colitis in mice. *World J Gastroenterol*. 2010; 16 (6): 703–12.
27. Suzuki F, Grand E, Bowman C. TNF-alpha and interleukin 1 activate gastrin gene expression via MAPK- and PKC-dependent mechanisms. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2001; 281 (6): G1405-1412.
28. El-Omar EM, Carrington M, Chow WH, McColl KE, Bream JH, Young HA, Herrera J [et al]. The role of interleukin-1 polymorphisms in the pathogenesis of gastric cancer. *Nature*. 2001; 412: 99.
29. Pollard JW. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat Rev Cancer*. 2004; 4: 71-8. doi: 10.1038/nrc1256
30. Wang TC, Golderring JR. Inflammation intersection: gp 130 balances gut irritation and stomach cancer. *Nature Medicine*. 2002; 8 (10): 1080-2.

УДК 577.27:591.85:[599.323.4]-047.37

**КОНЦЕНТРАЦИЯ ПРО- И АНТИВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ
В СЫВОРОТКЕ КРОВИ КРЫС ПОСЛЕ ДЛИТЕЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ ОМЕПРАЗОЛА
И ОДНОВРЕМЕННОГО ВВЕДЕНИЯ МУЛЬТИПРОБИОТИКОВ И ОМЕПРАЗОЛА**

Пилипенко С. В.

Резюме. На сегодняшний день данные литературы о роли цитокинов в воспалительном процессе в желудке и кишечнике, который развивается на фоне длительной гипоацидности желудочного сока при отсутствии *H. pylori* инфицирования, ограничены и касаются лишь отдельных цитокинов.

Цель исследования - исследовать баланс про- и противовоспалительных цитокинов в сыворотке крови крыс при длительной гипоацидности желудочного сока и влияние на него мультипробиотиков.

Исследования проведены на белых нелинейных крысах-самцах с начальной весом 160-180 г, разделенных на четыре группы по 10 животных в каждой. Крысы I группы служили контролем, им в течение 28 дней ежедневно внутривентриально (в/в) вводили 0,5 мл воды для инъекций. Крысам II группы ежедневно в течение 28 дней вводили один раз в сутки внутривентриально (в/в) омепразол (производства "Sigma-Aldrich" США) в дозе 14 мг/кг, растворенный в 0,2 мл воды для инъекций. Животным третьей группы один раз в сутки в течение 28 дней совместно вводили омепразол и мультипробиотик "Симбитер® ацидофильный" концентрированный (Симбитер). Животным четвертой группы один раз в сутки в течение 28 дней совместно вводили омепразол и мультипробиотик "Апибакт®" (Апибакт).

Мультипробиотики Симбитер и Апибакт (производства НПК "О.Д. Пролисок", Украина) вводили совместно с омепразолом п/о в дозе 140 мг/кг ($1,4 \cdot 10^{10}$ КОЕ/кг).

Подавление секреции гидрохлоридной кислоты в желудке крыс в течение 28-ми дней омепразолом приводило к дисбалансу между про- и противовоспалительными цитокинами: концентрации провоспалительных цитокинов ИФН- γ , ФНО- α , ИЛ-1 β существенно возрастали, ИЛ-12 40р уменьшалась, а ИЛ-6 без изменений. Одновременно менялись концентрации противовоспалительных цитокинов: концентрация ИЛ-4 уменьшалась, а ИЛ-10 росла.

Длительное введение мультипробиотических препаратов на фоне желудочной гипохлоргидрии существенно уменьшало проявления воспалительного процесса в слизистой желудка и толстой кишки, что проявлялось в нормализации баланса между про- и противовоспалительными цитокинами.

Ключевые слова: воспалительный процесс, цитокины, сыворотка крови, мультипробиотики, гипоацидность желудочного сока, омепразол.

UDC 577.27:591.85:[599.323.4]-047.37

Pro- and Antiphlogistic Concentration of Cytokines in Rats' Serum after Long-Term Administration of Omeprazole and the Simultaneous Injection of Multiprobiotics and Omeprazole

Pylypenko S. V.

Abstract. Nowadays, the literature data about the role of cytokines in stomach and intestines phlogistic processes develops against the backdrop of long hypoacidity of gastric juice in the absence of *H. pylori* infection is limited and applies only to certain cytokines.

The aim – to explore the balance of pro- and antiphlogistic cytokines in the rats blood serum during long hypoacidity of gastric juice and the impact of multiprobiotics.

Objects and methods. The research conducted on nonlinear white male rats with an initial weight 160-180 g, divided into four groups with 10 animals in each. Rats in group I served as control objects. They were intraperitoneally (i/o) administered 0.5 ml of water for injection within 28 days. The rats in Group II were daily intraperitoneally (i/o) injected omeprazole (produced by "Sigma-Aldrich" USA) at a dose of 14 mg/kg, dissolved in 0.2 ml of water for injection. The animals of the third group were once a day during 28 days administered multiprobiotic "Symbiter® acidophilic" concentrated (Symbiter together and omeprazole). Animals of the fourth group were administered omeprazole together with multiprobiotic "Apibakt®" once a day during 28 days.

"Multiprobiotics Symbiter and Apibact (produced by SPC "O.D. Prolisok", Ukraine) were administered together with omeprazole n/a dose of 140 mg/kg ($1,4 \cdot 10^{10}$ CFU/kg).

Results and discussion. As a result we identified that after 28 days of administration of omeprazole concentration of pro-inflammatory cytokine IFN- γ increased by 58,5% ($p < 0,05$).

The group of rats given the long-term co-administration of omeprazole and multiprobiotic "Symbiter" showed IFN- γ concentration in the serum at the level of 30,8% ($p < 0,05$) which is lower in comparison with the group of rats which were administered omeprazole alone. After a 28-day co-administration of omeprazole and multiprobiotic "Apibact" IFN- γ concentration in the serum of the rats was at 24,6% ($p < 0,05$) which is lower in comparison with the group of rats administered one of omeprazole and 19, 5% ($p < 0,05$) higher than the figure in control.

After 28 days of administration of omeprazole in rats increased serum concentration of TNF- α . This increase was 73,3% ($p < 0,05$).

The group of rats given the long-term co-administration of omeprazole and multiprobiotic drugs "Symbiter" and "Apibact" concentrations of TNF- α showed the rats serum decrease to 15,4% ($p < 0,05$) and 17,9% ($p < 0,05$), respectively, compared with the group of rats, which were injected only omeprazole during the same time. Compared with the control group of rats, the rats administered both omeprazole multiprobiotics "Symbiter"

and "Apibact" during 28 days indicated that the concentration of TNF- α in serum of the rats serum remained respectively 46,7% ($p < 0,05$) and 42,2% ($p < 0,05$) higher.

After 28-day administration of omeprazole to rats the concentration of pro-inflammatory cytokine IL-1 β increased 80,2% ($p < 0,05$) compared with the control group.

After a 28-day co-administration of omeprazole and rats multiprobiotic "Symbiter" concentration of IL-1 β in serum decreased to 22,5% ($p < 0,05$) compared with the group of rats which were administered one of omeprazole and by 39,6% more ($p < 0,05$) compared with the concentration of IL-1 β in the serum of the rats in the control group. The rats injected multiprobiotic "Apibact" and omeprazole during 28 days displayed the concentration of IL-1 β in serum at 40,5% ($p < 0,05$) which is lower than the group of rats administered only omeprazole, and not significantly different from the rate of the control group rats.

After 28-day administration of omeprazole the concentration of anti-inflammatory cytokine IL-4 in the rats serum was reduced by 39.8% ($p < 0.001$) compared with control group rats. Adding to omeprazole multiprobiotic "Symbiter" or "Apibact" prevented the decrease in the concentration of IL-4 in the rats serum. Under these conditions, the concentration of IL-4 was the same as in the control group of rats.

Long hypoacidic gastric juice induced omeprazole not to affect the concentration of the pro-inflammatory cytokine IL-6 in the blood serum of rats. Concomitant administration of omeprazole and multiprobiotic drugs to rats during the 28-day also rendered the effect of the concentration of IL-6 in rats blood serum.

After 28-day administration of omeprazole concentration of IL-10 in the rats blood serum grew by 44.4% ($p < 0.01$) compared with the control group of rats. Concomitant administration of omeprazole and multiprobiotic "Symbiter" or "Apibact" to rats during the 28-day prevented the increase in the concentration of IL-10 in the serum of rats.

After 28-day administration of omeprazole the concentration of pro-inflammatory cytokine IL-12 in rats blood serum reduced to 36,6% ($p < 0,01$) compared with control group of rats.

Conclusions. Inhibition of hydrochloric acid secretion in the rats stomach during the 28-day omeprazole injection resulted in the imbalance between pro- and anti-inflammatory cytokines, inflammatory cytokines concentration of IFN- γ , TNF- α , IL-1 β significantly increased, IL-12 decreased 40%, and IL-6 unchanged. At the same time, changing the concentration of anti-inflammatory cytokines was the following IL-4 concentration has reduced, and IL-10 concentration has increased.

Prolonged administration of multiprobiotic drugs on the background of gastric hypochlorhydria significantly reduced signs of inflammation in the mucous membranes of the stomach and colon, manifested in normalizing the balance between pro- and anti-inflammatory cytokines.

Keywords: inflammation, cytokines, serum, multiprobiotics, hypoacidity of gastric juice, omeprazole.

Стаття надійшла 09.06.2017 р.

Рекомендована до друку на засіданні редакційної колегії після рецензування